

JULIANA MIDORI SUMIDA

**Ozonioterapia *versus* Eletroacupuntura como tratamento de cães com discopatia
toracolombar: estudo prospectivo randomizado e cego**

São Paulo

2021

JULIANA MIDORI SUMIDA

**Ozonioterapia *versus* Eletroacupuntura como tratamento de cães com discopatia
toracolombar: estudo prospectivo randomizado e cego**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Ayne Murata Hayashi

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4089
FMVZ

Sumida, Juliana Midori
Ozonioterapia versus eletroacupuntura como tratamento de cães com discopatia toracolombar: estudo prospectivo randomizado e cego / Juliana Midori Sumida. – 2021.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Ayne Murata Hayashi.

1. Oxigênio-ozônio. 2. Acupuntura. 3. Extrusão de disco. 4. Dor. 5. Farmacopuntura.
I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 17 de abril de 2019

CEUA N 1990110118

(ID 004526)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Ayne Murata Hayashi

Área: Clínica Cirúrgica Veterinária

Título da proposta: "AVALIAÇÃO DA OZONIOTERAPIA NOS PONTOS DE ACUPUNTURA COMPARADA COM A ELETROACUPUNTURA EM CÃES PORTADORES DE DISCOPATIA INTERVERTEBRAL TORACOLOMBAR".

CERTIFICADO (Notificação versão de 11/fevereiro/2019)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Notificação (versão de 11/fevereiro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito a inclusão como pesquisadora colaboradora a Mestranda do Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-graduação Clínica Cirúrgica Veterinária, médica veterinária JULIANA MIDORI SUMIDA. No termo de consentimento livre e esclarecido já consta o nome dela como colaboradora no projeto. O objetivo desta notificação é a matrícula da mestranda pois acabou de passar no processo seletivo, e necessita que insira o seu nome no certificado do CEUA já aprovado. Grata Ayne Murata Hayashi".

Comentário da CEUA: Solicitação aprovada.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SUMIDA, Juliana Midori

Título: **Ozonioterapia versus Eletroacupuntura como tratamento de cães com discopatia toracolombar: estudo prospectivo randomizado e cego**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Zoé e Sadao (In memoriam), por tudo que fizeram por mim. Por todo exemplo de Virtude, Dedicação e Amor.

Aos meus irmãos Adriana, Érica, Simone e Thiago por todo apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Sadao e Zoé** (in memoriam), que sempre se empenharam em passar valores e virtudes, nos ensinaram a importância da educação e do conhecimento. Obrigada por todos os exemplos e por todo Amor. Sou grata por tudo e tanto que se esforçaram na minha criação e dos meus irmãos. Saudades infinitas.

A minha avó **Akiko** (in memoriam), que participou ativamente da minha educação, cuidou de mim e dos meus irmãos, foi um privilégio ter tido esse convívio por toda a minha infância e grande parte da minha vida.

Aos meus irmãos **Adriana, Erica, Simone e Thiago**, por tudo que passamos e passaremos, por toda a amizade e cuidado, por todo aprendizado mútuo. Sempre juntos.

A minha querida orientadora **Ayne**, mais do que uma mestra, mais do que uma professora, é uma grande amiga. Você é um exemplo de ser humano e de profissional que espalha Luz por onde passa. Tenho orgulho de poder conviver e sempre aprender com você. Agradeço o incentivo e a oportunidade, todos os ensinamentos e sua enorme paciência e amizade. Este trabalho não seria possível se não fosse todo o seu empenho. Gratidão!

A **Profa Dra. Julia Maria Matera** por ter aceitado ser minha orientadora inicialmente para que eu pudesse ingressar no mestrado. Muito obrigada pela ajuda, ensinamentos e apoio.

Gratidão também a **Profa Dra. Denise Tabacchi Fantoni**, pelo apoio e ajuda sempre.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia, **Lívia dos Santos Gimenes e Belarmino Ney Pereira**, pela paciência e auxílio em todos os processos desde as provas para ingressar no mestrado, as avaliações semestrais e ajuda em todas as dúvidas! Muito obrigada! **Lívia** muito obrigada pela paciência e por me atender sempre com tanto carinho e cuidado! Gratidão!

A todos os funcionários da FMVZ/USP, mas principalmente aos enfermeiros **Cledson Lelis dos Santos, Jesus dos Anjos Vieira e José Miron Oliveira da Silva** por me ajudar e socorrer tantas vezes, agradeço muito por todo apoio!

Meu muito obrigada a todos os professores, veterinários contratados, pós-graduandos, residentes e estagiários com quem pude conviver e aprender, pela amizade e troca de conhecimento! Principalmente para a amiga **Nadia Yuri Shimosaka** pelo acolhimento no fases iniciais do projeto, pela amizade e exemplo de doçura. E às

estagiárias Susan, Natália e Gabriela, que se empenharam em auxiliar no projeto.
Gratidão!

Às agências de fomento **FAPESP e CAPES** que forneceram o auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

À Instituição **FMVZ-USP** por me acolher e dar a oportunidade de realizar este trabalho.

Muita gratidão a todos os tutores que puderam trazer os cães para participarem do projeto e aos queridos pacientes que compareceram aos atendimentos.

A todos os animais que nada mais são do que um exemplo de Amor e tanto podem ensinar ao ser humano.

*“O Tao gera, a Virtude cria,
a matéria forma, a circunstância se constitui.*

*Assim, todos os seres veneram o Tao
e estimam a Virtude.*

*O Tao é excelso e a Virtude é preciosa,
não interferem no percurso natural de todas as criaturas.*

*O Tao por gerar e a Virtude por criar
fazem crescer e nutrir;*

fazem amadurecer e desafiar;

fazem o sustento e a cobertura.

Gerar sem tomar posse;

agir sem criar dependência;

cultivar sem controlar;

eis como se exprime a misteriosa Virtude.”

Lao Tsé

RESUMO

SUMIDA, J.M. **Ozonioterapia versus eletroacupuntura como tratamento de cães com discopatia toracolombar: estudo prospectivo randomizado e cego.** 2021. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A ozonioterapia na medicina veterinária está sendo cada vez mais utilizada no auxílio do controle da dor devido a sua ação antiinflamatória local e sistêmica. Os efeitos da aplicação da ozonioterapia (em pontos de acupuntura) foram comparados com a eletroacupuntura (EA), sendo esta última, reconhecidamente efetiva na recuperação neurológica e no controle da dor em cães com quadro de discopatia intervertebral toracolombar (DDIV). Foram atendidos durante o período de agosto de 2018 a março de 2020, trinta e oito cães de raças condrodistróficas puros ou mestiços, com sinais de DDIV toracolombar, com graus de lesão neurológica de 1 a 4. Estes, foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo EA - aplicação de eletroacupuntura na frequência denso-dispersa de 3 e 100 Hz, durante vinte minutos nos pontos B20 e B23, E36 e R3 transpassando com B60 e agulha seca em Bai Hui lombar e Grupo OZO - aplicação paravertebral da mistura ozônio-oxigênio na concentração de 20 mcg/mL, 3mL em cada ponto de acupuntura B20, B23, Bai Hui lombar, E36 e entre R3 e B60. Destes 38 cães, apenas 13 foram incluídos no grupo EA e 15 no grupo OZO. As avaliações dos parâmetros de evolução clínica e do estado neurológico foram realizadas semanalmente, durante quatro semanas e/ ou a última avaliação, seguindo uma escala funcional numérica (EFN) de 0 a 23. A dor foi avaliada através da escala visual analógica interativa dinâmica - Dynamic interactive visual analog scale (DIVAS), variando de 0 a 10. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico Graphpad InStat. O nível de significância foi de 5%, e para amostras não paramétricas e comparação de duas médias foi utilizado o teste de Mann Whitney. Para medidas repetidas de amostras não paramétricas e comparação de várias médias, foi utilizado o teste de Friedman. Para medidas repetidas de amostras paramétricas e comparação de várias médias, foi utilizado o teste de Tukey-Kramer. Assim, o score de avaliação da dor (DIVAS) e a escala funcional numérica (EFN) foram comparados em momentos diferentes e entre os grupos EA e OZO. Os dois

grupos demonstraram serem homogêneo e puderam ser comparados durante o tempo dos tratamentos. As características clínicas dos cães de lesão de grau 1 e 2 foram comparados entre os grupos EA e OZO, assim como os cães de grau de lesão 3 e 4, não sendo observadas diferenças significativas. Quanto ao tempo de retorno à locomoção (em dias) dos cães de graus 3 e 4, não houve diferença significativa entre os grupos EA ($10,6 \pm 5,4$) e OZO ($14,5 \pm 15,7$). Pode-se concluir que a ozonioterapia foi eficaz no controle de dor e reabilitação motora e sensorial em cães com sinais de discopatía toracolombar à semelhança com a eletroacupuntura. A aplicação de O₂-O₃ nos pontos de acupuntura demonstrou ser um tratamento minimamente invasivo, eficaz, seguro e de rápida aplicação. Mais estudos são necessários para avaliar as outras vias de aplicação sistêmica que poderiam beneficiar a reabilitação destes animais e outras afecções.

Palavras-chave: oxigênio-ozônio; acupuntura; extrusão de disco; dor; farmacopuntura

ABSTRACT

SUMIDA, J. M. **Randomized single-blinded prospective study of ozone therapy versus electroacupuncture for canine thoracolumbar disk disease.** 2021. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Ozone therapy has been increasingly used by veterinary medicine in the aid of pain control due to its local and systemic anti-inflammatory action. The effects of the application of the ozone therapy (acupuncture points) were compared with the electroacupuncture which is already recognized as effective in the neurological return and pain control in dogs presenting thoracolumbar intervertebral disk disease. Thirty-eight chondrodystrophic breed dogs and mongrel dogs - mixed chondrodystrophic breed dogs with thoracolumbar intervertebral disk disease, neurological signs grades 1 to 4, were referred during the period from August 2018 to March 2020. These were randomly divided into two groups: group EA - application of electroacupuncture at a dense-disperse frequency of 3/100 Hz, for twenty minutes at points BL20 and BL23, ST36 and KI3 transfixated with BL60 and dry needle at lumbar Bai Hui and group OZO - paravertebral application of the ozone-oxygen mixture at a concentration of 20 mcg/mL, 3 mL at acupuncture points BL20, BL23, Bai Hui lumbar, ST36 and between KI3 and BL60. From these 38 dogs, only 13 were included in the group EA and 15 in the group OZO. Evaluations of the parameters of clinical evolution and the neurological state were accomplished weekly, during four weeks and/or the last evaluation, following a numerical functional scale (EFN) from 0 to 23. The pain was evaluated through the dynamic interactive visual analogue scale (DIVAS), varying from 0 to 10. Statistical analyses were performed using the Graphpad Instat statistical program. The significant level was 5%, the Mann Whitney test for non-parametric samples was used for the comparison of two means. For repeated measurements of non-parametric samples and comparison of several means, the Friedman test was used. For repeated measures of parametric samples and comparison of several means, the Tukey-Kramer test was used. The pain assessment score (DIVAS) and the numerical functional scale (EFN) were compared at different times and between the EA and OZO groups. The two groups were homogeneous and could be compared during the

time of treatments. The clinical data of the grade 1 and 2 dogs were compared between the groups EA and OZO, as well as the grade 3 and 4 dogs with no significant differences. The time to return to locomotion (in days) of the grade 3 and 4 dogs, had no significant difference between the EA (10.6 ± 5.4) and OZO (14.5 ± 15.7) groups. It was concluded that ozone therapy was effective in pain control and motor and sensory rehabilitation in dogs with signs of thoracolumbar discopathy, similarly to electroacupuncture. The application of O_2-O_3 at acupuncture points has been shown to be a minimally invasive, effective, safe and quick to apply treatment. More studies are needed to evaluate other systemic application pathways that could benefit the rehabilitation of these animals and other clinical conditions.

Keywords: oxygen-ozone; acupuncture; disk extrusion; pain; pharmacopuncture

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (Introdução geral) - Gerador de ozônio MedPlus V (Philozon®)	20
Figura 2 (Introdução geral) - Animal durante tratamento com eletroacupuntura utilizando aparelho de eletroestimulação EL-608 NKL®.....	22
Figure 3 (Capítulo 1) – Oxidative effects of ozone.....	26
Figure 4 (Capítulo 1) – Ozone generator device and a dog receiving ozone bagging for a skin wound with ulcer at distal extremity of right thoracic limb.....	29
Figure 5 (Capítulo 1) – Paravertebral ozone application in a dog suffering thoracolumbar disk disease, also called chemical acupuncture.....	31
Figure 6 (Capítulo 1) - A- Autologous blood collection with ozone already in a syringe for minor autohemotherapy. B - Minor autohemotherapy applied at an acupuncture point - GV14, localized between C7 -T1 vertebrae for immunological modulation.....	33
Figura 7 (Capítulo 2) - Fluxograma dos cães atendidos durante o período de agosto de 2018 a março de 2020 – FMVZ-USP.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Capítulo 2) - Comparação do escore de avaliação de dor (DIVAS) em diferentes momentos e entre os grupos EA e OZO (nível de significância $p < 0.05$) - FMVZ-USP.....	54
Tabela 2 (Capítulo 2) - Distribuição da Escala Funcional Numérica (EFN) em diferentes momentos e comparação entre os momentos e entre os grupos EA e OZO- FMVZ-USP.....	55
Tabela 3 (Capítulo 2) - Distribuição da escala funcional numérica (EFN) em diferentes momentos e comparação entre os momentos e entre os grupos EA e OZO em cães com grau de lesão 1 e 2 - FMVZ-USP.....	56
Tabela 4 (Capítulo 2) - Distribuição da escala Funcional Numérica (EFN) em diferentes momentos e comparação entre os momentos e entre os grupos EA e OZO em cães com grau de lesão 3 e 4 - FMVZ-USP.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO (GERAL).....	18
2. CAPÍTULO 1	23
2.1. INTRODUCTION	24
2.2. HISTORY	24
2.3. MECHANISM OF ACTION	25
2.4. INSTRUMENTAL AND OZONE APPLICATION TECHNIQUES.....	26
2.4.1. Ozone generating devices	26
2.4.2. Ozone Therapy techniques	27
2.4.2.1 Local techniques	27
2.4.2.2. Systemic application techniques.....	31
2.5. CONTRAINDICATIONS AND CARE	34
2.6. POSSIBILITIES OF CLINICAL INDICATIONS	34
2.7. CONCLUSION	40
2.8. FUNDING	40
2.9. DECLARATION.....	40
2.10. REFERENCES	41
3. CAPÍTULO 2	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
3.1. INTRODUÇÃO.....	50
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.3. RESULTADOS	53
3.4. DISCUSSÃO	57
3.5. CONCLUSÃO.....	66
3.6. REFERÊNCIAS	66
4. CONCLUSÃO GERAL	72
6. REFERÊNCIAS (GERAL).....	73

7. ANEXOS	79
------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO (GERAL)

A discopatia intervertebral (DDIV) toracolombar é uma das afecções neurológicas mais comuns na rotina veterinária. A degeneração do disco intervertebral pode ocorrer por uma protusão ou extrusão do núcleo pulposo para o interior do canal medular provocando uma lesão na medula espinhal, podendo ser consequente de uma compressão ou concussão e acarretar mielopatia compressiva (BRAUND, 1986; COATES, 2000; JERRAM; DEWEY, 1999). A DDIV tem uma maior incidência, de 85%, na região toracolombar, enquanto 15% ocorrem na região cervical e 2% na região lombo-sacra (BRAUND, 1986; COATES, 2000; YOVICH; READ; EGER, 1994; HAYASHI; MATERA, 2005; HAYASHI *et al.*, 2013).

O animal com a DDIV toracolombar pode ser classificado em Grau de 1 a 5, na dependência dos sinais clínicos e neurológicos presentes, que podem variar de hiperestesia até paraplegia associada ou não à disfunção urinária e fecal (JANSSENS, 1992; JERRAM; DEWEY, 1999; OLBY; DYCE; HOULTON, 1994; YOVICH; READ; EGER, 1994).

Estudos descreveram uma degeneração condróide que foi particularmente prevalente em raças conhecidas como condrodistróficas, que têm características de ossificação endocondral alterada com ossos longos encurtados. Recentemente, foi identificado o locus em cromossomo 12 associado à calcificação do disco em Dachshunds. e, posteriormente, a identificação de uma expressão do Retrogene FGF4 nesse locus associado à extrusão de disco intervertebral em cães condrodistróficos. É provável que a degeneração nuclear e extrusão anular ocorre como parte de uma etiologia multifatorial nestes cães associado à influência do retrogene FGF4 e a biomecânica da raça condrodistrófica (FENN; OLBY, 2020). Os tratamentos descritos para essa afecção incluem: repouso, antiinflamatórios, acupuntura e/ou descompressão cirúrgica os quais visam o alívio e a remissão dos sintomas, além de evitar recidivas do processo (HAN *et al.*, 2010; HAYASHI; MATERA; FONSECA PINTO, 2007; JOAQUIM *et al.*, 2010). A aplicação da ozonioterapia nesses quadros pode ser uma nova alternativa de tratamento (OLIVEIRA JUNIOR; LAGES, 2012).

A ozonioterapia em animais tem sido utilizada como agente terapêutico no tratamento de diversas doenças com efeitos benéficos, devidos às propriedades bioquímicas do O₃, produzindo efeitos analgésicos, antiinflamatórios, antioxidantes e

imunomoduladores. Os eventos que promovem esses efeitos podem ser resumidos por: ativação do metabolismo celular, redução da síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias ou liberação de compostos alérgicos, aumento da liberação de citocinas imunossupressoras, redução do estresse oxidativo por meio da indução da síntese de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase), aumento da oferta de O_2 nos tecidos e estimulação da angiogênese (BOCCI, 2005; LATINI *et al.*, 2019; PENIDO; LIMA; FERREIRA, 2010). As abordagens e técnicas locais e sistêmicas descritas para o tratamento de humanos podem ser transpostas para uso em animais, tais como a insuflação retal, terapia com bolsa, óleo ozonizado, aplicações intradisciais e paravertebrais, em pontos de acupuntura, subcutânea, auto-hemoterapia menor e auto-hemoterapia maior (PETEOACĂ *et al.*, 2020; SCHWARTZ *et al.*, 2020, SCIORSCI *et al.*, 2020).

A aplicação de O_2-O_3 tem ação, particularmente, no auxílio do controle da dor devido ao efeito antiinflamatório local e sistêmico (AVILÉS, 2013; BIAZZO CORRIERO; CONFALONIERI, 2018, PENIDO; LIMA; FERREIRA, 2010; PETEOACĂ *et al.*, 2020; SCIORSCI *et al.*, 2020; SUMIDA; MATERA; HAYASHI, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2013). O ozônio terapêutico é obtido a partir do oxigênio puro medicinal, sendo a conversão feita por geradores de ozônio (Figura 1), no momento do seu uso. O produto final é uma mistura dos dois gases, o oxigênio-ozônio (O_2-O_3), sendo 5% o ozônio. Quadros algícos decorrentes de discopatias podem ser tratados com ozonioterapia por diversas vias descritas como: via intradiscal, subcutânea regional, muscular, supralaminar paravertebral e insuflação retal (BOCCI, 2005; OLIVEIRA JUNIOR; LAGES, 2012).

Figura 1: Gerador de ozônio MedPlus V (Philozon®) - Processo FAPESP 2018/06769-8 FMVZ-USP



Fonte: Sumida (2020) – FMVZ-USP

Alguns estudos e relatos em humanos e animais demonstram a ação do ozônio no tratamento da discopatia intervertebral (APUZZO *et al.*, 2016; AVILÉS, 2013; BALLARDINI, 2005; BIAZZO; CORRIERO; CONFALONIERI, 2016; BOCCI *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2007; JANG *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2012; MUTO *et al.*, 2016; OLIVEIRA JUNIOR; LAGES, 2012; STEPPAN *et al.*, 2010; SUMIDA; MATERA; HAYASHI, 2019; VIGLIANI; BONIPERTI; SCUDO, 2005). São descritos dois métodos de aplicação local, a forma direta e indireta. O método direto consiste na aplicação do gás O_2-O_3 intradiscal e o indireto, na aplicação em pontos de músculos paravertebrais correspondentes aos metâmeros do disco herniado. Este último método também é considerado acupuntura química ou farmacopuntura, quando aplicado nos pontos de acupuntura, devido aos resultados benéficos serem obtidos com o uso do ozônio como reagente químico, ao invés da inserção da agulha. Desta forma, permite a obtenção de uma série complexa de reações neurológicas e químicas que levam à diminuição da dor na maioria (respostas positivas em 70-80% dos casos) dos pacientes com dor na coluna vertebral (BOCCI *et al.*, 2015).

Alguns mecanismos de ação têm sido propostos para explicar a eficácia do O_2-O_3 no tratamento das discopatias, como a redução de componentes inflamatórios, atuando diretamente na cascata de inflamação e agindo na quebra do ácido araquidônico em prostaglandinas inflamatórias. Pode atuar em uma melhor oxigenação do tecido lesado,

em que o fluxo venoso e arterial é afetado e estimula o processo de reparação, promovendo a atividade fibroblástica e indução da deposição de colágeno (MUTO *et al.*, 2016).

Muito tem se utilizado e estudado sobre a ozonioterapia na medicina humana e veterinária, porém poucos estudos clínicos foram realizados e publicados (BOCCI 2005; OLIVEIRA JUNIOR; LAGES, 2012; PETEOACĂ *et al.*, 2020; SCIORCI *et al.*, 2019).

Os efeitos terapêuticos de técnicas da medicina tradicional chinesa se mostraram eficazes para o tratamento dos sinais relacionados à discopatia toracolombar. A acupuntura e eletroacupuntura correspondem a terapias integrativas já reconhecidas como efetivas em controlar a dor e acelerar a recuperação motora e sensorial nos casos de discopatias (CHENG *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2010; HAYASHI; MATERA; FONSECA PINTO, 2007; JOAQUIM *et al.*, 2010, LAI *et al.*, 2008; LAIM *et al.*, 2009; LIN; CHEN, 2019; LIN; LIU, 2015; TSAI; LIN; HSIEH, 2015).

A eletroacupuntura consiste no uso de corrente elétrica que passa através das agulhas inseridas nos pontos de acupuntura (Figura 2). Este método apresenta algumas vantagens em comparação ao agulhamento manual: permite realizar uma mimetização do estímulo manual da agulha e o controle e mensuração de frequências, amplitudes e a duração do estímulo. Em baixas frequências (2–10 Hz), são principalmente liberadas endorfinas e encefalinas, além de recrutar mecanismos colinérgicos noradrenérgicos e muscarínicos. Em frequências mais altas (50–100 Hz), o opioide primário liberado é a dinorfina e são recrutados mecanismos colinérgicos muscarínicos e GABAérgicos para ajudar a mitigar a sinalização nociceptiva. É provável que o fornecimento de outros agentes de alívio da dor em frequências mais altas junto com a EA em baixa frequência possa ter um efeito aditivo (DEWEY; XIE, 2021). Por outro lado, a frequência alta (80–120 Hz) estimula a liberação de endorfinas, sendo usada para o tratamento de dor e espasmos musculares. A frequência baixa (5–20 Hz) é utilizado na reeducação dos neurônios motores nos casos de paresias ou paralisias (FERGUNSON, 2011). A eletroacupuntura é muito utilizada nos casos de nevralgias, patologias degenerativas do sistema nervoso e para promover a analgesia. Pode ser usada na realização de alguns procedimentos cirúrgicos, não promovendo analgesia cirúrgica, mas sim hipoalgesia, necessitando assim da aplicação de outros fármacos conjuntamente (HAYASHI; MATERA, 2005; XIE; PREAST, 2011).

Figura 2 – Animal durante tratamento com eletroacupuntura utilizando aparelho de eletroestimulação EL-608 NKL® (Processo FAPESP 2018/06769-8) – FMVZ-USP



Fonte: Sumida (2020) – FMVZ USP

Além disso, pesquisas avaliaram os efeitos da eletroacupuntura liberando fatores neurotróficos e sua relação com plasticidade neural, como diminuição do inibidor de crescimento de neurite Nogo-A (WU *et al.*, 2015), expressão de mRNA do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) (YANG *et al.*, 2016), aumento na expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (SUN; ZHAO; WANG, 2008) e S100 β (HAYASHI *et al.*, 2013).

Este estudo prospectivo randomizado e cego teve como objetivo analisar o efeito da ozonioterapia nos pontos de acupuntura comparando com a eletroacupuntura no tratamento de cães de raças condrodistróficas com sinais clínicos de discopatia toracolombar. A hipótese é de que o ozônio aplicado nos pontos de acupuntura possa ter efeito semelhante à eletroacupuntura, já reconhecida como eficaz em controlar a dor e acelerar a recuperação motora e sensorial nos casos de discopatias.

2. CAPÍTULO 1

OZONE THERAPY IN VETERINARY MEDICINE: CLINICAL INDICATIONS AND TECHNIQUES

Juliana Midori Sumida*, Ayne Murata Hayashi

Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo – São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: jmsumida@usp.br

Texto originalmente submetido para publicação no periódico: Acta Veterinaria Brasilica. Submetido em 04 de março de 2021.

ABSTRACT - Ozone therapy application and research have increased recently. The mixture of oxygen-ozone (O₂-O₃) has been used as a therapeutic agent for the treatment of several diseases with beneficial effects. This brief literature review has the objective of disclosing the mechanisms of action and main clinical indications and possibilities of ozone therapy for different conditions. The local and systemic approaches and techniques described for humans treatment can be easily transposed for use in animals, such as rectal insufflation; bag therapy; ozonated oil; intradiscal and paravertebral applications; in acupuncture points; minor autohemotherapy and major autohemotherapy. The possibilities of clinical indications and dosages were also described, including immunological and infectious diseases. Although it is a minimally invasive and relatively safe approach, more clinical studies are necessary to standardize techniques, doses and clinical indications.

Key words: pain, antioxidant, disk disease, chemical acupuncture, autohemotherapy, COVID-19

ABBREVIATIONS

AMD: dry age related macular degeneration; AHM: Major Autohemotherapy; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CRP: C-Reactive protein; LDH: Lactate

Dehydrogenase; LOP: Lipid Oxidation Product; MiAH: Minor Autohemotherapy; O₃: Ozone; O₂: Oxygen; ROS: Reactive Oxygen Species; RIO₃: Rectal Insufflation

2.1. INTRODUCTION

Therapeutic ozone is generated when pure medicinal oxygen is converted through ozone generators, producing a mixture of the two gases, 5% of which is ozone (OLIVEIRA JUNIOR; LAGES, 2012).

Ozone therapy is a modality increasingly used for various diseases in human and veterinary medicine. Although in veterinary medicine most publications are on large animals, their use in dogs and cats has grown exponentially in recent years, requiring further research and studies (TEIXEIRA et al., 2013, HAYASHI; FRIOLANI, 2018, KAWAHARA et al., 2019, SCIORSCI et al., 2020).

The oxidative effect of ozone promotes bactericidal, fungicidal and virucidal properties. It is used in the treatment of circulatory arterial diseases, external ulcers, skin lesions, immunodeficiency, hepatitis, supportive therapy in cancer patients, inflammations and dental treatments. Because of ozone virucidal effect and indirect immunity stimulation, several studies for the treatment of herpes and human immunodeficiency are being done (PENIDO; LIMA; FERREIRA, 2010).

Since 2011, a consensus is being published: "Madrid Declaration on ozone therapy". In 2020 an update included a veterinary and a dentistry addendum (SCHWARTZ; SÁNCHEZ, 2012; SCHWARTZ; SÁNCHEZ; SABAHA, 2015; SCHWARTZ et al., 2020).

The purpose of this brief literature review is to disclose the mechanisms of action, main indications and possibilities for the use of ozone therapy under different conditions in veterinary medicine. Also, to describe the several types of application in small animal.

2.2. HISTORY

Martinus van Marum discovered ozone in 1781 and Christian Friedrich Schonbein synthesized ozone in 1840, when, working with a voltaic pile in the presence of oxygen, he noticed the appearance of a gas with an "electric and pungent smell", which they called *ozone*, from the Greek *ozein* (odor). The use of ozone in medicine developed during the

last century and it was stimulated by the lack of antibiotics and the positive disinfectant ozone properties (BOCCI, 2005; SCHWARTZ; SÁNCHEZ, 2012).

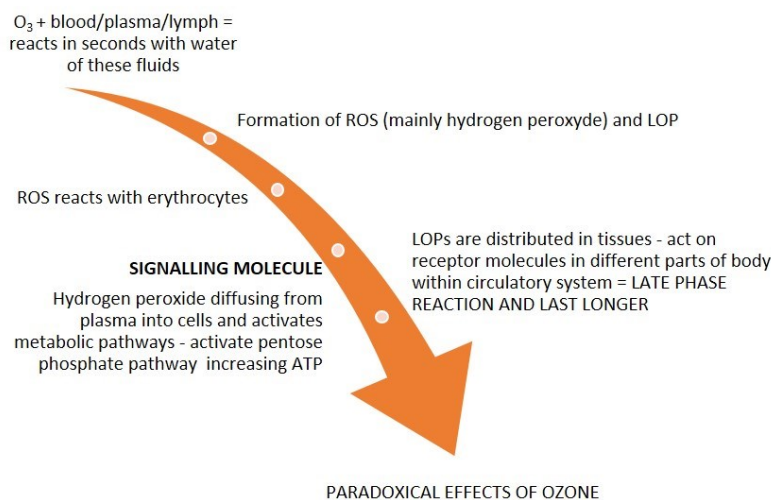
In the 1970s, Alexander Balkanyi in Zurich was perhaps the first to inject small volumes of ozone into patients affected by tendonitis and myofascial pain. Others used ozone to treat polyarthritis, osteoarthritis, epicondylitis, carpal tunnel syndrome and Morton's disease or neuroma with intra-articular or periarticular insufflation of a gas mixture of O₂-O₃ (BOCCI et al., 2015).

2.3. MECHANISM OF ACTION

The ozone (O₃) is a potent oxidizer and has a more selective activity over the organic compounds (PENIDO; LIMA; FERREIRA, 2010). The likely mechanisms of action of this mixture of O₃ (5%) and medical O₂ (95%) are due to the biochemical properties of O₃ producing analgesic, anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. The events that promote these effects can be resumed by: activation of cellular metabolism, reduction of proinflammatory prostaglandins synthesis or release of algogenic compounds, increase of release of immunosuppressive cytokines, reduction of oxidative stress through the induction of the synthesis of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase), increase of O₂ supply at tissues and stimulation of angiogenesis (BOCCI, 2006; LATINI et al., 2019; PENIDO; LIMA; FERREIRA, 2010).

The therapeutic efficacy of ozone therapy is due to the controlled and moderate oxidative stress produced by O₃ reactions with various biological components (Figure 3). The calculated and transient oxidative stress induced by O₃ generates a number of second messengers in several intracellular signals (BOCCI, 2006; LATINI et al., 2019). This property of ozone is known as paradoxical action because it plays a role as an oxidizing molecule and can increase the antioxidant properties of regions affected by the disease (SCIORSI et al., 2020).

Figure 3 – Oxidative effects of ozone



O₃ = ozone; ROS = Reactive Oxygen Species; LOP= Lipid Oxidation Product; ATP= Adenosine Triphosphate. Font: LATINI et al., 2019

2.4. INSTRUMENTAL AND OZONE APPLICATION TECHNIQUES

Several instruments and techniques of ozone application will be described below. As it is a highly unstable molecule, the proximity of the ozone generating device during the application is necessary, so that its collection is performed moments before the treatment, allowing the reliability of the correct dose and concentrations.

2.4.1. Ozone generating devices

Ozone (O₃) is generated when a diatomic oxygen molecule (O₂) is separated. The free oxygen resulting from the breakdown of the molecule reacts with other diatomic oxygen (O₂) molecules forming the triatomic ozone molecule (O₃). In order for the oxygen molecule to break down, a large amount of energy is required which may be due to electrical discharges, chemical electrolysis and ultraviolet light radiation. It can still be produced by thermal, radiochemical and electrochemical methods (SCHWARTZ; SÁNCHEZ, 2012; SILVA et al., 2011).

The triatomic form is unstable and its stability is temperature dependent. Thus, at 20 ° C the average life of the O₃ gas is 40 minutes and at 30 ° C, the average life is 25 minutes

(BOCCI, 2005). Thus, it can not be stored and its use must be carried out right after its collection.

Commercial ozone production is carried out by the electric discharge process, also called the corona process. This consists of two electrodes subjected to a high potential difference (approximately 1000 V). Ozone is generated by the passage of air or pure oxygen between the two electrodes (SCHWARTZ; SÁNCHEZ, 2012; SILVA et al., 2011). When the electrons have enough energy to dissociate the oxygen molecule, collisions start to occur that cause the dissociation of oxygen and the consequent formation of ozone (SCHWARTZ; SÁNCHEZ; SABAH, 2015).

2.4.2. Ozone Therapy techniques

Several techniques of applying medical ozone are described. Both local and systemic via are described. The different ways of ozone therapy can be used alone or together in order to obtain a synergistic effect. Usually, the frequency of applications is variable according to general conditions of the patient, age, and primary disease, it can be done two times a week, but adaptations must be done at each case. General rule is each five ozone sessions, an increase of ozone dose as a cycle, and these cycles can vary between 15 or 20 sessions. Clinical improvement is observed between five to ten applications, due to activation of the self-defense antioxidant mechanism. All materials must be ozone resistant, like glass, silicon probes/tubes/syringe (SCHWARTZ; SÁNCHEZ; SABAH, 2015). It is described a therapeutic window of secure ozone concentrations between 10 to 60 μmL , without toxicity or side effects (KAWAHARA et al., 2019).

2.4.2.1 Local techniques

A- Rectal Insufflation

The rectal application of drugs is an initially local modality, but it can be used for administration of systemic drugs. Rectal ozone insufflation has low toxicity and corresponds a popular via in veterinary medicine due to its easy application and because it is an alternative to the use of major autohemotherapy (SANCHEZ; RE, 2012; TEIXEIRA et al., 2013).

It consists of the ozone rectal application assisted with an urethral probe. The gas quickly dissolves within the content of the intestinal lumen, reacts with mucoproteins and other released substances with antioxidant activity and produces reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation products (LOPs) that penetrate the mucosa. They are absorbed via blood and lymphatic circulation (SCHWARTZ; SÁNCHEZ; SABAH, 2015).

The rectal insufflation dosage of ozone can be low (10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), medium (20-25 $\mu\text{g}/\text{m}$) and high (30-35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) doses. The volume to apply is 3mL/kg of weight (SCHWARTZ et al., 2020).

B - Ozone Bagging

The ozone bagging is widely used in veterinary medicine for wounds and purulent skin infections, ulcers and skin diseases. The $\text{O}_2\text{-O}_3$ mixture is pumped into an ozone-resistant bag, such as silicone or polypropylene, that is then placed around the area to be treated, but previously moistened with distilled water to facilitate the penetration through the lesion site. Ozone reacts with minerals, so the bi-distilled/distilled water or water purified by reverse osmosis process has lesser reagents to produce not desirable products (BHATT et al., 2016; SCHWARTZ; SÁNCHEZ; SABAH, 2015). The $\text{O}_2\text{-O}_3$ mixture is inflated by a vacuum system until the bag is full. The wound to be treated will be completely surrounded by the gas, and it must be acting for 20 to 30 minutes (Figure 4) (SCHWARTZ; SÁNCHEZ; SABAH, 2015). The concentration usually used is 15-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a low dose, 30-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a medium dose and a 40- 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a high dose (SCHWARTZ et al., 2020).

Figure 4 – Ozone generator device and a dog receiving ozone bagging for a skin wound with ulcer at distal extremity of right thoracic limb.



Fonte: Sumida (2020)

C - Ozonated oil

Ozonated oil can be used topically and orally. The oil is a carrier of ozone. This kind of ozone application was very safe and have demonstrated activity for use in the prevention and treatment of chronic local infections, to topical antimicrobial agents, in treatment of wounds and foot ulcers in patients with diabetes, anaerobic infections, herpetic infections (HSV I and II), trophic ulcers and burns, cellulitis, abscesses, anal fissures, decubitus ulcers (bed sores), fistulae, fungal diseases, furunculosis, gingivitis, and vulvovaginitis (BOCCI, 2005; UGAZIO et al., 2020). Ozonated oil is produced incorporating the O_2 - O_3 mixture into triglycerides where gaseous ozone chemically reacts with unsaturated substrates leading to therapeutically active ozonated derivatives (ozonide). The ozonide compositions deliver active O_2 and/or other useful species deep within the lesion without causing primary skin irritation. They have the capacity to eliminate the pathogens and then, by releasing oxygen (O_2), activates the proliferation of fibroblasts, hence the building of intercellular matrix with consequent proliferation of keratin blasts and successive healing. The most commonly used oils are olive oil, sesame oil and sunflower oil (TRAVAGLI et al., 2010; UGAZIO et al., 2020). Successful treatment with topic ozonated oil was described for skin lesions in a dog (SILVA JÚNIOR et al., 2019). Oral treatment can be also administered for H. Pylori infection for human patients (SOTO; ROMO-VASQUEZ; WEBER-CHULIÁ, 2018).

D - Intradiscal

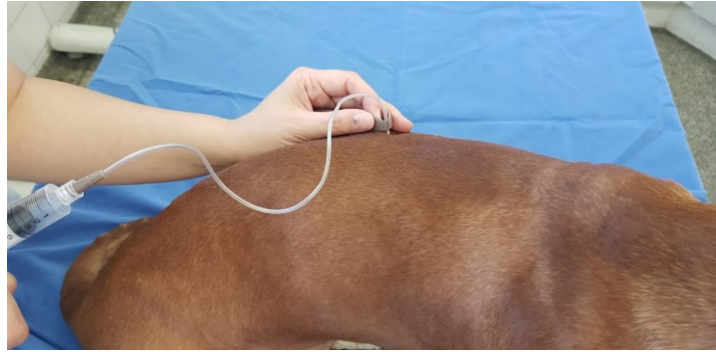
The intradiscal route, consists of the application of the O₂ – O₃ mixture in the altered intervertebral disc space, assisted by radiographic control using the radiological arc mobile or fluoroscopy or computed tomography. Ozone dissolves in the interstitial fluid and reacts with the biomolecules of the local tissue. A cascade of ROS is generated by reacting with the proteoglycans, of the nucleus pulposus, leading to their rupture and degeneration of the matrix with progressive decrease and disappearance of the herniated material. Because of the reduction of mechanical irritation, the sensitivity of axons decreases, although there are others mechanisms of pain in disk disease and spinal cord lesions (BOCCI et al., 2015).

E - Paravertebral

It consists of the application of O₂ – O₃ in the paravertebral region, being minimally invasive, safe and effective to relieve pain. The advantage observed was that this technique is easy to perform especially in small animals and horses, not requiring computed tomography or anesthesia (BIAZZO; CORRIERO; CONFALONIERI, 2018).

The paravertebral muscles are used as a route for O₂–O₃ infiltration, (Figure 5). A systematic review and meta-analysis of ozone therapy for low back pain secondary to herniated disc indicated the level of evidence is II-3 (evidence obtained from diagnostic studies of uncertainty) for ozone therapy applied intradiscally and II-1 (evidence obtained from at least one properly conducted diagnostic accuracy study of adequate size) for ozone therapy applied at the paravertebral muscle and periforaminally for long-term pain relief based on USPSTF - levels of evidence based on the quality data available in the literature (USPSTF- U.S. Preventive Services Task Force criteria). The available evidence produced a 1C strength of recommendation (strong recommendation, low quality or very low-quality evidence - may change when higher quality evidence becomes available) for ozone therapy applied into the disc and 1B (strong recommendation, moderate quality evidence - can apply to most patients in most circumstances without reservation) for ozone applied at the paravertebral muscles or periforaminally (HARRIS et al., 2001; MAGALHÃES et al., 2012).

Figure 5 - Paravertebral ozone application in a dog suffering thoracolumbar disk disease, also called chemical acupuncture.



Fonte: Sumida (2020)

The paravertebral dosage of ozone can be low ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$), medium ($10 \mu\text{g}/\text{m}$) and high ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$) doses. The volume to apply is about 0.5 - 10 mL/application (SCHWARTZ et al., 2020).

F- Vesicourethral insufflation

Direct ozone into vesicourethral is described for inflammatory, neoplasia, interstitial, bacterial or radiation cystitis (TEKE et al., 2017). It can be done with an urethral probe. The medium dosage is $15 \mu\text{g}/\text{mL}$. It can be previously combined with ozonated water insufflation (CLAVO et al., 2005; SCHWARTZ; SÁNCHEZ; SABAH, 2015; SCIORSCI et al., 2020).

The low dosage is $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, the medium dosage is $15 \mu\text{g}/\text{m}$ Land the high dosage is $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ The volume can vary 5 to 50 mL/application (SCHWARTZ et al., 2020).

2.4.2.2. Systemic application techniques

Ozone can be used for systemic action and the most common will be described. The local ozone rectal insufflation is also considered systemic, but it has been previously described.

A- Intraperitoneal

This kind of ozone application is considered in the initial study phase and is not yet recommended for application in humans and animals. However, it is described in experimental studies for the treatment of neoplasms (SCHULZ et al., 2008; ROSSMANN et al., 2014) and demonstrated improvement in neurodegenerative changes in the cerebral cortex of elderly rats (EL-MEHI; FARIED, 2020). Intraoperative abdominal lavage is described in humans with peritonitis using 5 to 10 liters of ozonized saline solution in a concentration of 4 a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 20 minutes (SCHWARTZ et al., 2020).

B - Major ozonated autohemotherapy

The MAH consists of collecting a sample blood volume in a bag containing anticoagulant, then mixing with $\text{O}_2\text{-O}_3$ and administering intravenously. Variations in microcirculation and metabolic changes that have been stable over time have been observed, such as an increase in cerebral oxygenation after about 1.5 hour of ozonated blood infusion and an increase in cytochrome c oxidase activity and concentration for up to 40 min after the end of treatment (BALLARDINI, 2006; RIMINI et al., 2016; TSUZUKI et al., 2015).

One can collect 1mL/kg of blood sample and ozone dosage can be low (10-20 $\mu\text{g}/\text{m}$), médium (20-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and high (30-35 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The total volume of application is calculated: 1-1,5 mL/kg of weight (SCHWARTZ et al., 2020).

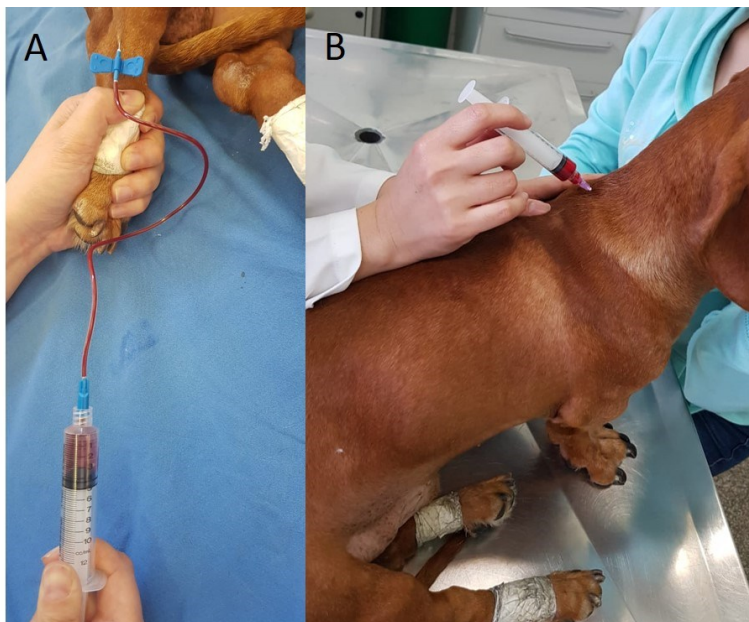
It is indicated for arterial circulation diseases, infections, rheumatic arthritis, immunostimulation, and carcinoma in geriatric patients (PENIDO; LIMA; FERREIRA, 2010). The AMD (dry age-related macular degeneration) has been treated with major ozonated autohemotherapy with positive influence on visual acuity (BORRELLI et al., 2012).

C - Minor ozonated autohemotherapy

It works as an autovaccine, widely used for the purpose of immunomodulation. It consists of the application of autologous blood collected, and after homogenization with ozone, applied intramuscularly or at an acupuncture point (Figure 6) with the purpose of immunomodulation. Indications are in general for dermatological diseases like dermatitis, psoriasis, allergies and adjuvant for oncological disease and chronic debilitating diseases. Blood sample can be collected by 0,1-0,5mL/kg (SCHWARTZ;

SÁNCHEZ; SABAHA, 2015; SCHWARTZ et al., 2020). The ozone dosage can be low (10-15 $\mu\text{g}/\text{m}$), medium (15-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and high (30-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the volume of application is 0.1-0.2 mL/kg (SCHWARTZ et al., 2020).

Figure 6 - A- Autologous blood collection with ozone already in a syringe for minor autohemotherapy. B - Minor autohemotherapy applied at an acupuncture point - GV14, localized between C7 -T1 vertebrae for immunological modulation.



Fonte: Sumida (2020)

The therapeutic ozone dosages are divided according to their mechanism of action and route of application. The low doses are used for immunomodulatory effect and when the immune system is very much compromised, like neoplasia, elderly and debilitated patients. The medium doses are used for immunomodulatory function and able to stimulate the antioxidant enzyme defense system. It is indicated for chronic degenerative diseases such as diabetes, atherosclerosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Parkinson syndrome, Alzheimer, and senile dementia. The high doses is used for inhibitory effect on the mechanisms, which occur in autoimmune diseases like rheumatoid arthritis and lúpus, or to treat ulcers or infected injuries (SCHWARTZ et al., 2020).

Others routes of ozone administration can be used such as intra articular, subcutaneous, paratendon and trigger points. For intra articular ozone route, the dosage can vary from

low (8 µg/ mL), medium (10 µg/ mL) and high (25 µg/ mL). The volume varies from 0.5 to 10 mL per application (SCHWARTZ et al., 2020)

2.5. CONTRAINDICATIONS AND CARE

Contraindications for the use of ozone in humans are described, such as Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase deficiency (Favism, acute hemolytic anemia), hemochromatosis, toxic hyperthyroidism (Basedow-Graves disease). In severe thrombocytopenia in humans, it is recommended not to use when below 50,000 platelets. Also, if there is severe cardiovascular instability, acute myocardial infarction, alcohol intoxication, treatment with iron or copper and during seizure status it is not recommended the ozone application (SCHWARTZ; SANCHEZ; SABAH, 2015). There is no studies in veterinary medicine to establish the recommended limits.

One must take care during the use of ozone and not direct inhale because it is toxic for upper airway and lungs. Signs of epiphora, rhinitis, cough, headache and less common, nausea and vomiting are side effects (BOCCI, 2005; SCIORSCI et al., 2020). Important interactions with ozone are the antioxidants, like vitamin C and E, so they must be administered before or after ozone therapy, not during the therapy, because the interference with ozone mechanisms of action and results. Ozone increases the effects of angiotensin-converting-enzyme inhibitors. Treatment with copper and iron is contraindicated together with ozone therapy. However, synergic effects are observed with laser, magnetic therapy, acupuncture and diathermy (SCHWARTZ; SANCHEZ; SABAH, 2015).

2.6. POSSIBILITIES OF CLINICAL INDICATIONS

In small animals, the great application of ozone therapy has been in pain control (BIAZZO et al., 2018; SUMIDA; MATERA; HAYASHI, 2019; TEIXEIRA et al., 2013), intervertebral disk disease (HAN et al., 2007), arthropathies (AVILÉS, 2013; TARTARI et al., 2020), dermatopathies (BORGES et al., 2019; JORDAN et al., 2019) and in the treatment of infectious diseases such as ehrlichiosis (GARCIA et al., 2010), leishmaniasis (MODA et al., 2014), and feline viral immunodeficiency (KAWAHARA et al., 2019). In large animals, in addition to diseases common to small animals such as arthropathies, disk disease and treatment of pain and wounds in horses (BHATT et al., 2016), mastitis and

reproductive disorders in domestic ruminants (ĐURIČIĆ et al., 2016; IMHOF et al., 2019; SAMARDŽIJA et al., 2017).

A chronic increase in oxidative stress is seen in serious conditions such as myocardial infarction, stroke, chronic limb ischemia, COPD, type II diabetes, and AMD. Initial inflammation occurs followed by excessive release of ROS, causing a diffuse cell injury that must be corrected by an inducible expression of the innate detoxifying and antioxidant system. ROS could activate the transcription factor (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) Nrf2, which increases the expression of antioxidant enzymes. Nrf2 could be activated by ozone therapy, and when properly activated, is able to restore redox homeostasis and possibly improve health (BOCCI; VALACCHI, 2015). Reports of studies with various diseases in animals have demonstrated the effect of ozone therapy in neutralizing oxidative stress such as an improve in the antioxidant capacity after MAH application in thoroughbred horses (TSUZUKI et al., 2015), cisplatin-induced nephrotoxicity (BORREGO et al., 2004) , reduced lipid and protein oxidation markers and decreased lipofuscin pigment deposition in rat liver and kidneys in a pre-ageing ozone administration (SAFWAT et al., 2014), reperfusion injury of hepatic and renal ischemia (AJAMIEH et al., 2004; YU et al., 2017) and diabetic nephropathy (MORSY; HASSAN; ZALAT, 2010) and improvement in neurodegenerative changes in the cerebral cortex in rats (EL-MEHI; FARIED, 2020).

The most frequent diseases veterinary treated with ozone therapy and their most common applications routes can be seen elsewhere. For example, gastrointestinal diseases, pancreatitis, chronic gastroenteritis, anemias and immune mediated thrombocytopenia with Ht >20% and acute and chronic kidney disease could have the ozone application route like major autohemotherapy, minor autohemotherapy and rectal insufflation (SCIORSCI et al., 2020; SCHWARTZ et al., 2020).

A. Neurological diseases

Studies in rats have shown that intraperitoneal application therapy with controlled ozone induce oxidative preconditioning, thus reversing oxidative stress, with an improvement in neurodegenerative changes in the cerebral cortex of elderly rats (EL-MEHI; FARIED, 2020).

B. Inflammatory and infectious diseases

Recently, cohort studies and case reports using ozone therapy as a complementary treatment have been published in patients diagnosed with the pandemic virus COVID-19. The articles describe the ozone techniques used: major autohemotherapy (WU et al., 2020; ZHENG; DONG; HU, 2020; HERNÁNDEZ et al., 2020; HERNÁNDEZ et al., 2021), intramuscular application (BROWNSTEIN et al., 2020), rectal insufflation (FERNÁNDEZ-CUADROS et al., 2020; FERNÁNDEZ-CUADROS et al., 2020) and intravenous ozonized saline solution (SCHWARTZ et al., 2021).

Some reports related good results on ozone therapy for inflammatory and infectious diseases in veterinary medicine. An application of rectal ozone insufflation in animals with positive PCR for canine parvovirus study, demonstrated 20 times higher mortality in the control group when compared to the dogs of the treated group (TRALDI, 2019). Garcia et al. (2010) related the use of ozonated MAH in canine ehrlichiosis treatment. The use of ozone therapy as an adjuvant treatment for visceral leishmaniasis is described by Moda et al. (2014). Infected dogs undergoing rectal insufflation treatment showed a decreased of serum urea and creatinine values at the end of treatment, showing better performance than the intra-abdominal treatment.

Kawahara et al. (2019) described a successful treatment of a cat with feline viral immunodeficiency with ozone therapy by means of minor and major autohemotherapy and rectal insufflation. No side effects were observed.

C. Musculoskeletal diseases

Avilés (2013), studied the anti-inflammatory and analgesic effects of ozone and growth factors derived from ozone-activated platelets in dogs with osteoarthritis in the hips and with spinal pain or pain in the extremities. O₂– O₃ was applied in the periarticular region and in painful paravertebral regions, resulting in a significant improvement.

An experimental study in horses evaluated the transient inflammatory reactions induced by intra-articular administration of medicinal ozone affecting joint components, by in vivo inflammatory evaluation, anti-inflammatory and oxidative biomarkers and extracellular matrix degradation products in synovial fluid in healthy horse joints. Analyzes of synovial fluid did not reveal significant changes in the concentrations of the

main biomarkers of cartilage inflammation and catabolism, indicating that intra-articular application of medicinal ozone in horses seems safe (VENDRUSCOLO et al., 2018). Another study verified the action of ozone therapy application on an experimental model of rheumatoid arthritis in Wistar rats. It was observed effectively reduced inflammation through reduction of pro-inflammatory cytokines and activation of IL-10 anti-inflammatory cytokine (TARTARI et al., 2020).

Coelho et al. (2015), reported a mare case diagnosed with chronic laminitis (grade IV according to Obel) with signs of lameness and reluctance to walk, radiographic measurements revealed displacement of the distal phalanx. Corrective cutting and administration of O₂-O₃ (intramuscularly, peritendinous and rectal insufflation) was performed. The animal showed improved body condition, better ambulation and the radiological evaluation after treatment showed a normal relationship between the dorsal hull wall.

D. Intervertebral disk diseases

For the treatment of disk disease, two methods are described: direct and indirect. The direct method consists of an intradiscal application and the indirect method, in a paravertebral application. This last form is also considered chemical acupuncture, due to the beneficial results being obtained with the application of ozone as a chemical reagent through the insertion of the needle. The role of this technique is related to obtain a complex series of neurological and chemical reactions that lead to decreased pain in the majority of patients with pain in the spine, with positive responses in 70-80% of cases (BOCCI et al., 2015). In an observational and prospective study realized in humans in Guantanamo, ozone therapy was applied paravertebrally in diseases of the spine. Most patients moved to a lower pain category and 80.7% were evaluated in the mild-moderate category after ozone therapy (CUBA RODRIGUEZ et al., 2019).

The effects of application of intradiscal and paravertebral ozone are: inhibition of prostaglandin E₂ and phospholipase A₂, similar to steroids; inhibition of other pro-inflammatory cytokines (IL 1, 2, 8, 12, 15, α interferon); (IL 1, 2, 8, 12, 15, α interferon); increased release of immunosuppressive cytokines (IL10, factor B1) producing analgesic and anti-inflammatory effects; increase of local microcirculation; reduces venous stasis and hypoxia in the nerve root producing analgesic effect; effect on the

mucopolysaccharides and proteoglycans of the nucleus pulposus, which is called ozonolysis, producing a chemical discolysis with the loss of water and dehydration; matrix degeneration, which is replaced by collagen fibers reducing the volume of the disc (SCHWARTZ; SANCHEZ, 2012).

Han et al. (2007), reported the percutaneous application of intradiscal O₂ – O₃ guided by fluoroscopy in dogs with thoracolumbar disk disease. A significant reduction of the intervertebral disk volume was observed in computed tomography and all dogs recovered their gait function and did not present recurrence. Jang et al, (2009) described the application of ozone on a Shih-Tzu dog with spinal cord compression in the cervical region and presenting progressive tetraplegia. O₂–O₃ was applied intraoperatively in the affected intervertebral spaces together with ventral decompression surgery in the intervertebral space. After the procedure, there was no more cervical pain and complete resolution of neurological deficits.

E. Painful conditions

Biazzo et al. (2016), reported the application of O₂-O₃ in intramuscular paravertebral lumbar regions, every seven days for a total of six sessions, for the treatment of low back pain in humans. It was observed that 79% of the patients showed improvement in pain conditions.

Teixeira et al. (2013), investigated the postoperative analgesic effects of ozone administered intrarectally or at acupuncture points compared with meloxicam, in bitches submitted to ovariohysterectomy. All groups obtained satisfactory analgesia for 24 hours, but the group that received ozone at the acupuncture points needed analgesic rescue. Ozone had no measurable adverse effects and was a good option to promote pain relief, being the intrarectal route with analgesic control in 24 hours.

Ballardine (2005) and Vigliani et al. (2005) reported the use of O₂–O₃ in sports horses with musculoskeletal disorders and pain. Ozone's subcutaneous and paravertebral application was performed, and remission of symptoms good and pain relieved was noticed.

Two dogs with neck pain refractory to analgesic medication have been treated by ozone. The O₂–O₃. was applied by rectal insufflation and at acupuncture points bilaterally in the

two paravertebral cervical points, GV14, GB21, BL23, lumbar Bai Hui, obtaining pain control, with DIVAS=0 after four applications (SUMIDA; MATERA; HAYASHI, 2019).

F. Oncologic conditions

Rossmann et al. (2014) reported a considerable efficacy of the application of O₂-O₃ intraperitoneally in rabbits implanted with papillomavirus associated auricular carcinoma VX2, which serves as a model for the study of head and neck cancer in humans. Host acquired tumor resistance and tumor regression were observed. Another study by Schulz et al. (2008) using rabbits inoculated with squamous cell carcinomas of the head and neck, observed a complete remission of 50% of the animals treated also with intraperitoneal administration.

Other studies in animal's model and humans, refer to the use of ozone as an adjuvant in the treatment of cancer, which may accelerate the healing after tumor resection surgery. Other effects described were: the ozone's capacity to induce direct damage on tumor cells, enhance the radiotherapy and chemotherapy effects, immune modulation, alter locoregional blood flow, and causes tumor hypoxia that provides additional support for potential beneficial effects during cancer treatment (CLAVO et al., 2018).

G. Dermatologic conditions

In veterinary medicine, skin diseases are very common conditions and can be one of the main indications for the application of ozone therapy. For modulation of immunity both methods, systemic and local applications can be used. The local application also has antiseptic, antibacterial, antifungal, and healing stimulation effects. Borges et al. (2019) and Jordan et al. (2019) described the use of ozone bagging and rectal insufflation in dermatologic cases and obtained remission of circumscribed, alopecic skin lesions, distributed diffusely along the body, with crusty and scaly, mild itching and various bacterial infections.

H. Hepatic diseases

The combination of rectal ozone insufflation and the chinese formula (Yigan Fuzheng Paidu) was used in the induced acute liver injury. This treatment combination was

superior when compared with the other groups (only ozone, only chinese formula, control). It managed to control the dog's general conditions and also, the survival rates were higher with normal levels of liver enzymes and less liver damage on histopathological examination (LI et al., 2007).

1. Ophthalmologic diseases

There are reports of ozone application for ophthalmic diseases in the treatment of dry eye syndrome, diabetic retinopathy, endophthalmitis, choroidal dystrophy, AMD, retinitis pigmentosa, chronic glaucoma in human medicine (BORRELLI et al., 2012; SCHWARTZ; SÁNCHEZ; SABAH, 2015). In veterinary medicine, Marchegiani et al. (2019) and Spadea et al. (2018), described the use of the Ozodrop® liposomal ozone lubricating ophthalmic solution (Fb Vision, Ascoli Piceno, Italy) based on hypromellose, liposomes and ozonized oil. It was observed that ozone-based eye drops have anti-inflammatory and bactericidal activity, promote tissue repair and can be successfully used in various ophthalmic pathologies like recurrent conjunctivitis and chronic keratitis.

2.7. CONCLUSION

Recently, the use of ozone therapy has been intensified in clinical practice due to its multiple applications, minimally invasive and relatively safe approach. However, the understanding of all biochemical and pharmacodynamic mechanisms are not yet fully elucidated. More scientific clinical studies are essential to expand its applicability and standardize effective dose and techniques for several diseases in veterinary medicine.

2.8. FUNDING

The authors would like to thank São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant#2018/06769-8. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

2.9. DECLARATION

This article will be part of the Master Degree dissertation of the corresponding author.

2.10. REFERENCES

AJAMIEH, H.H. et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia - Reperfusion. **Liver International**. v. 24, n. 1, p. 55–62, 2004.

AVILÉS, M.H. Use of ozone and ozonated growth factors in musculoskeletal disorders of the canine species. **Revista Española de Ozonoterapia**, v. 3, n. 1, pp. 95-98, 2013.

BALLARDINI E. Oxygen-Ozone therapy for spinal muscle disorders in the horse. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v.4, p.70-73, 2005.

BALLARDINI, E. Changes in Haemochromocytometric Values in Horses after Ozone Auto-haemotransfusion. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v.5, p.47-52, 2006.

BHATT, J. et al. An overview of ozone therapy in equine- an emerging healthcare solution. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 4, p. S203–S210, 2016.

BIAZZO, A.; CORRIERO, A.S.; CONFALONIERI, N. Intramuscular oxygen-ozone therapy in the treatment of low back pain. **Acta Biomedica**, v. 89, n. 1, p. 41–46, 2018.

BOCCI, V. **Ozone: A New Medical Drug**. Netherlands: Springer, 2005, 259 p.

BOCCI, V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research**, v. 37, p. 425-435, 2006.

BOCCI, V.; BORRELLI E.; ZANARDI I.; TRAVAGLI V. The usefulness of ozone treatment in spinal pain. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 2677–2685, 2015.

BOCCI, V.; VALACCHI, G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p.1-6, 2015.

BORGES, T.L. et al. Ozonioterapia no tratamento de cães com dermatite bacteriana: relato de dois casos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.32, 11 p, 2019.

BORREGO, A. et al. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Mediators of Inflammation**, v.13, p. 13-19, 2004.

BORRELLI, E. et al. Effects of major ozonated autohemotherapy in the treatment of dry age related macular degeneration: a randomized controlled clinical study. **International Journal of Ophthalmology**, v.5, p.708-713, 2012.

BROWNSTEIN, D. et al. 2020. A Novel Approach to Treating COVID-19 Using Nutritional and Oxidative Therapies. **Science, Public Health Policy, and The Law**, v.2, p. 4-22, 2020.

CLAVO, B. et al. Intravesical Ozone Therapy for Progressive Radiation-Induced Hematuria. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.11, n.3, p. 539–541, 2005.

CLAVO, B. et al. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.9. p. 1-11, 2018.

COELHO, C.S. et al. Use of ozone therapy in chronic laminitis in a horse. **Journal of Ozone Therapy**, v.1, n.1, p. 1-4, 2015.

CUBA RODRIGUEZ, L.C. et al. Ozonoterapia paravertebral en la patología de la columna vertebral lumbar. **Revista Información Científica**, v.98, n.3, p. 64-73, 2019.

ĐURIČIĆ, D. et al. Comparison of intrauterine antibiotics versus ozone medical use in sheep with retained placenta and following obstetric assistance. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 538–540, 2016.

EL-MEHI, A.E.; FARIED, M.A. Controlled ozone therapy modulates the neurodegenerative changes in the frontal cortex of the aged albino rat. **Annals of Anatomy**, v. 227, p. 1-8, 2020.

FERNÁNDEZ-CUADROS, M.E. et al. Effect of Rectal Ozone (O₃) in Severe COVID-19 Pneumonia: Preliminary Results. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v. 2, p. 1328–1336, 2020.

FERNÁNDEZ-CUADROS, M.E. et al. Ozone (O₃) and SARS-CoV-2: Physiological Bases and Their Therapeutic Possibilities According to COVID-19 Evolutionary Stage. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v. 2, p. 1094–1102, 2020.

GARCIA, C.A. et al. The use of ozonated major autohemotherapy in canine ehrlichiosis' treatment: case report. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 41, p. 1–6, 2010.

HAN, H.J. et al. Fluoroscopic-guided intradiscal oxygen-ozone injection therapy for thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs. **In Vivo**, v. 21. p.609-614, 2007.

HARRIS, R.P. et al. Current Methods of the U.S. Preventive Services Task Force: A Review of the Process. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 20, n. 3, p. 21–35, 2001.

HAYASHI, M.P., FRIOLANI M. Aplicabilidade clínica cirúrgica da ozonioterapia em pequenos animais: Revisão de Literatura. **Revista Unimar Ciências**, v.27, n.1-2, 2018.

HERNÁNDEZ, A. et al. Potential Role of Oxygen–Ozone Therapy in Treatment of COVID-19 Pneumonia. **American Journal of Case Reports**, v.21, p.1-6, 2020.

HERNÁNDEZ, A. et al. Ozone therapy for patients with COVID-19 pneumonia: preliminary report of a prospective case-control study. **International Immunopharmacology**, v. 90, 2021.

IMHOF, S. et al. Therapy of retained fetal membranes in cattle: comparison of two treatment protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 206, p. 11–16, 2019.

JANG, H.Y. et al. A case of intradiscal oxygen-ozone injection therapy for cervical herniated intervertebral disc in a dog. **Journal of Veterinary Clinics**, v.26, n.3. p. 273-275, 2009.

JORDAN, M.V.R. et al. Evaluación de Ozonoterapia en Dermatopatía Generalizada en Perros. **European Scientific Journal ESJ**, v. 15, n. 6, p. 364–379, 2019.

KAWAHARA, R. et al. Ozonioterapia no tratamento da Imunodeficiência Viral Felina (FIV): relato de caso. **Revista Nosso Clínico**, n.132, 2019.

LATINI, E. et al. Ultrasonography for oxygen-ozone therapy in musculoskeletal diseases. **Medical Gas Research**, v.9, n.1, p. 18-23, 2019.

LI, L-J. et al. Protective effects of medical ozone combined with traditional chinese medicine against chemically-induced hepatic injury in dogs. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 45, p. 5989-5994, 2007.

MAGALHAES, N.D.O. et al. Review Ozone Therapy as a Treatment for Low Back Pain Secondary to Herniated Disc: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. **Pain Physician**, v.15, p. E115-129, 2012.

MARCHEGANI, A. et al. Preoperative topical liposomal ozone dispersion to reduce bacterial colonization in conjunctival sac and periocular skin: Preliminary study in dogs. **Experimental Eye Research**. v.179, p.1-6, 2019.

MODA, T.F. et al. Efeitos da ozonização intra-abdominal e intra-retal sobre a avaliação renal de cães acometidos por leishmaniose visceral. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, Uberlândia, 2014, p.1900-03.

MORSY, M.D.; HASSAN, W.N.; ZALAT, S.I. Improvement of renal oxidative stress markers after ozone administration in diabetic nephropathy in rats. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, p. 1–7, 2010.

OLIVEIRA JUNIOR, J.O.; LAGES, G.V. Ozonioterapia em lombociatalgia. **Rev Dor**, v. 13, n. 3, p. 261-270, 2012.

PENIDO, B.R.; LIMA C.A.; FERREIRA L.F.L. Aplicações da ozonioterapia na clínica veterinária. **Pubvet**, v.4, n.40, 2010.

RIMINI, D. et al. The speed of reinfusion affects the vascular system during ozone major autohemotherapy. **Ozone Therapy**, v. 1, p. 56-60, 2016.

ROSSMANN, A. et al. Intraperitoneal oxidative stress in rabbits with papillomavirus-associated head and neck cancer induces tumoricidal immune response that is adoptively transferable. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 16, p. 4289–4301, 2014.

SAFWAT, M.H. et al. Ozone ameliorates age-related oxidative stress changes in rat liver and kidney: Effects of pre- and post-ageing administration. **Biochemistry Moscow**, v.79, p. 450–458, 2014.

SAMARDŽIJA, M. et al. Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: a review. **Veterinarski Arhiv**, v. 87, n. 3, p. 363–375, 2017.

SANCHEZ, G.M.; RE L. Rectal administration and its application in ozonotherapy. **International Journal of Ozone Therapy**, v.11, n.1, p.41-49, 2012.

SCHWARTZ, A.; SÁNCHEZ, G.M. Ozone Therapy and Its Scientific Foundations. **Revista Española de Ozonoterapia**, v. 2, n. 1, p. 199-232, 2012.

SCHWARTZ, A.; SÁNCHEZ, G.M.; SABAHA, F. **Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia** 2nd ed. 2015.

SCHWARTZ, A. et al. **Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia**, 3rd ed. 2020.

SCHWARTZ, A. et al. Complementary Application of the Ozonized Saline Solution in Mild and Severe Patients with Pneumonia Covid-19: A Non-randomized Pilot Study. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v.9, n. 2, p. 126-142, 2021.

SCHULZ, S. et al. Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 10, p. 2360–2367, 2008.

SCIORSI, R.L. et al. Ozone Therapy in Veterinary Medicine: A Review. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 240–246, 2020.

SILVA, S.B. et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.2, p.659-682, 2011.

SILVA JÚNIOR, J.I.S. et al. Topical Ozone Therapy in the Treatment of Pharmacodermia in a Dog (*Canis lupus familiaris*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.47, p. 1-5, 2019.

SOTO, M.A.; ROMO-VÁZQUEZ, C.A.; WEBER-CHULIÁ, N. Endoscopy evidence; H. Pylori infection Ozonotherapy treated, Mexican cases report. **Revista Española de Ozonoterapia**, v.8, n.1, p. 171-179, 2018.

SPADEA, L. et al. Use of ozone-based eye drops: a series of cases in veterinary and human spontaneous ocular pathologies. **Case Reports in Ophthalmology**, v.9, n.2, p. 287-298, 2018.

SUMIDA, J.M.; MATERA, J.M.; HAYASHI; A.M. Ozone therapy as pharmacopuncture for cervical pain in dogs. In: Proceedings of the 45th IVAS Annual Congress on Veterinary Acupuncture, Wrocław, 2019, p 91.

TARTARI, A.P.S. et al. Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. **Inflammation**, v.43, p.985-993, 2020.

TEIXEIRA, L.R. et al. Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 794–799, 2013.

TEKE, K. et al. Preventive effect of intravesical ozone supplementation on n-methyl-nitrosourea-induced non-muscle invasive bladder cancer in male rats. **Experimental Animals**, v. 66, n. 3, p. 191-198, 2017.

TRALDI, R.F. **Uso da ozonioterapia como terapia complementar em cães diagnosticados com parvovirose**. 2019. 40 f. Dissertação (mestrando em anestesiologia, dor e acupuntura: Área de concentração em Cirurgia Animal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Botucatu, 2019.

TRAVAGLI, V. et al. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. **Mediators of Inflammation**, 2010.

TSUZUKI, N. et al. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.77, n. 12, p.1647-1650, 2015.

UGAZIO, E. et al. Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their Characterization, Current Applications, and Advances in Improved Delivery Techniques. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 1–24, 2020.

VENDRUSCOLO, C.D.P. et al. Effects of medical ozone upon healthy equine joints: clinical and laboratory aspects. **PLoS One**, v. 13, p.1-18, 2018.

VIGLIANI, A.; BONIPERTI, E.; SCUDO, E. Paravertebral O₂–O₃ treatment in mechanical lumbar pain in riding horses. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 4, p. 64-69, 2005

ZHENG, Z.; DONG, M.; HU, K. A preliminary evaluation on the efficacy of ozone therapy in the treatment of COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n.11, p. 2348-2350, 2020.

YU, G. et al. The NLRP3 inflammasome is a potential target of ozone therapy aiming to ease chronic renal inflammation in chronic kidney disease. **International Immunopharmacology**, v. 43, p. 203–209, 2017.

WU, J. et al. Case Report: Recovery of One ICU-Acquired COVID-19 Patient Via Ozonated Autohemotherapy. **The Innovation**. 2020.

3. CAPÍTULO 2

Ozonioterapia *versus* Eletroacupuntura como tratamento de cães com discopatia toracolombar: estudo prospectivo randomizado e cego

Randomized single-blinded prospective study of ozone therapy versus electroacupuncture for canine thoracolumbar disk disease

Juliana Midori Sumida*, Julia Maria Matera, Ayne Murata Hayashi

Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Autor correspondente*: jmsumida@usp.br

RESUMO

A ozonioterapia em animais está sendo utilizada no auxílio do controle da dor devido efeito antiinflamatório local e sistêmico. Comparou-se a ozonioterapia nos pontos de acupuntura com a eletroacupuntura, sendo esta última, efetiva na recuperação neurológica e no controle da dor em cães com discopatia toracolombar (DDIV). Cães condrodistróficos/mestiços, graus de lesão 1 a 4, foram divididos aleatoriamente em grupo EA (n=13) – EA nos pontos B20, B23, E36 e R3 transfixado com B60 e agulha seca em Bai Hui lombar e grupo OZO (n=15) - aplicação paravertebral de 3 mL de ozônio (20 µg/mL), nos pontos de acupuntura B20, B23, Bai Hui lombar, E36 e R3/B60. Avaliações neurológicas semanais foram realizadas de acordo com uma Escala Funcional Numérica (EFN: 0-23) durante quatro semanas. A dor (0-10) foi avaliada através da escala análoga visual interativa dinâmica (DIVAS). As características clínicas iniciais foram homogêneas em ambos os grupos, podendo ser comparados evolutivamente. Não foram observadas diferenças significativas da DIVAS e EFN entre os grupos EA e OZO, havendo uma melhora progressiva do controle da dor e condição neurológica. O mesmo foi encontrado quando comparados os grupos EA e OZO em cães de grau 1 e 2 e graus 3 e 4. O tempo de retorno a locomoção (dias) dos cães de grau de lesão 3 e 4, entre os grupos EA (10,6±5,4) e OZO (14,5±15,7), não tiveram diferença significativa. Conclui-se que a ozonioterapia foi eficaz no controle da dor e na reabilitação motora e sensorial

em cães com sinais de discopatia toracolombar à semelhança com a eletroacupuntura. A sua aplicação demonstrou ter a vantagem de ser uma técnica rápida e de fácil manejo, além de que, a via paravertebral e subcutânea não necessita de anestesia e de outros métodos de imagem avançada, sendo segura e eficaz.

Palavras-chave: oxigênio-ozônio; acupuntura; extrusão de disco; canina; dor; farmacopuntura

ABSTRACT

Ozone therapy in animals is being used to control pain due to its local and systemic anti-inflammatory action. Ozone therapy at acupuncture points was compared with electroacupuncture (EA), the latter being effective in neurological recovery and pain control in dogs with thoracolumbar discopathy (DIV). Chondrodystrophic/Mongrel dogs, lesion grades 1 to 4, were randomly divided into group EA (n = 13) - EA at acupuncture points BL20, BL23, ST36 and KID3 transfixed with BL60 and dry needle in lumbar *Bai Hui* and group OZO (n = 15) - paravertebral application of 3 mL of ozone (20 µg / mL), at acupuncture point BL20, BL23, lumbar *Bai Hui*, ST36 and KID3 / BL60. Weekly neurological assessments were performed according to the Numerical Functional Scale (EFN: 0-23), for four weeks. Pain (0-10) was assessed using the dynamic interactive visual analog scale (DIVAS). The initial clinical characteristics of both groups were homogeneous, making the comparison possible along the treatment. There were no significant differences in DIVAS and EFN between the groups, with a progressive improvement in pain control and neurological condition. The same was found when comparing groups EA and OZO in dogs of grades 1 and 2 and grades 3 and 4. The time of return to locomotion (days) of dogs of grade 3 and 4, between groups EA (10, 6 ± 5.4) and OZO (14.5 ± 15.7), had no significant difference. It was concluded that ozone therapy was effective in pain control and motor and sensory rehabilitation in dogs with signs of thoracolumbar discopathy, similarly to electroacupuncture. Its application has shown to have the advantage of being a quick and easy-to-handle technique, in addition to the fact that the paravertebral and subcutaneous route does not require anesthesia and other advanced imaging technology, being safe and effective.

Keywords: oxygen-ozone; acupuncture; disk extrusion; canine; pain; pharmacopuntura

3.1. INTRODUÇÃO

A discopatia intervertebral (DDIV) toracolombar é uma afecção neurológica decorrente da protrusão ou extrusão do núcleo pulposo para o interior do canal medular, podendo acarretar mielopatia compressiva. Estudos descreveram uma degeneração condróide que foi particularmente prevalente em raças conhecidas como condrodistróficas, que têm características de ossificação endocondral alterada com ossos longos encurtados, como as raças Shih-tzu, Lhasa apso, Buldogues Franceses, Dachshunds, Pequinês, Beagles, Basset Hounds, Cocker Spaniels e Pembroke Welsh Corgis. Recentemente, foi identificado o locus em cromossomo 12 associado à calcificação do disco em Dachshunds, e, posteriormente, a identificação de uma expressão do Retrogene FGF4 nesse locus associado à extrusão de disco intervertebral em cães condrodistróficos. Essas raças também carregam uma inserção de retrogene FGF4 no cromossomo 18 que está associada à condrodissplasia responsável pela característica de membros extremamente curtos. É provável que a degeneração nuclear e extrusão anular ocorre como parte de uma etiologia multifatorial nestes cães associado a influência do retrogene FGF4 e a biomecânica da raça condrodistrófica. (Fenn e Olby, 2020).

Os sinais clínicos variam de hiperestesia até paraplegia associada ou não à disfunção urinária e fecal. Os tratamentos descritos para essa afecção incluem: repouso, antiinflamatórios, acupuntura e/ou descompressão cirúrgica os quais visam o alívio e a remissão dos sintomas, além de evitar recidivas do processo (Hayashi et al., 2007; Joaquim et al., 2010). A aplicação da ozonioterapia nesses quadros parece ser uma nova alternativa de tratamento (Oliveira Junior e Lages, 2012). Muito tem se utilizado e estudado sobre a ozonioterapia na medicina humana e veterinária, porém poucos estudos clínicos foram realizados e publicados (Bocci 2005; Oliveira Junior e Lages, 2012; Peteoacă et al., 2020; Sciorci, 2019).

A ozonioterapia em animais está sendo utilizada no auxílio do controle da dor devido efeito antiinflamatório local e sistêmico (Avilés, 2013; Biazzo et al., 2018; Penido et al., 2010; Peteoacă et al., 2020; Sciorsci et al., 2020; Sumida et al., 2019; Teixeira et al., 2013). O ozônio terapêutico é obtido a partir do oxigênio puro medicinal, sendo a conversão feita por geradores de ozônio, no momento do seu uso. O produto final é uma mistura dos dois gases, o oxigênio-ozônio (O_2-O_3), sendo 5% o ozônio. Quadros álgicos decorrentes de discopatias podem ser tratados com ozonioterapia por diversas vias

descritas como: via intradiscal, subcutânea regional, muscular, supralaminar paravertebral e insuflação retal (Bocci 2005; Oliveira Junior e Lages, 2012).

A aplicação da acupuntura e eletroacupuntura já são reconhecidas como eficazes em controlar a dor e acelerar a recuperação motora e sensorial nos casos de discopatias toracolombares (Cheng et al., 2015; Dragomir et al., 2021; Han et al., 2010; Hayashi et al., 2007; Joaquim et al., 2010; Lai et al., 2008; Laim et al., 2009; Lin e Chen, 2019; Lin e Liu, 2015; Tsai et al., 2015). O uso do O₂-O₃ em dores espinhais, de forma indireta na região paravertebral, é considerado farmacopuntura, quando aplicada nos pontos de acupuntura (Bocci, 2005).

Este estudo prospectivo randomizado e cego teve como objetivo de analisar o efeito da ozonioterapia nos pontos de acupuntura comparando com a eletroacupuntura no tratamento de cães com sinais clínicos de discopatia toracolombar. A hipótese é de que o ozônio aplicado nos pontos de acupuntura possa ter efeito semelhante à eletroacupuntura, já reconhecida como eficaz em controlar a dor e acelerar a recuperação motora e sensorial nos casos de discopatias.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais, junto ao departamento de cirurgia de um hospital veterinário, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – número 1990110118.

Animais – cães com sinais clínicos de DDIV toracolombar foram previamente atendidos na rotina do hospital veterinário e medicados conforme os sinais clínicos apresentados e o grau de lesão neurológica, com medicação analgésica e se necessário, antiinflamatórios e/ou antibióticos. No primeiro atendimento e nas avaliações futuras foram realizadas por um avaliador cego quanto ao tratamento realizado: a mensuração da dor através da escala DIVAS (Dynamic Interactive Visual Analogic Scale), descrito por Lasceles et al. (1998) e Shih et al. (2008), e exame neurológico, avaliando a locomoção, capacidade de manter-se em estação, propriocepção consciente, reflexos espinhais, reflexo cutâneo do tronco, reflexo anal, presença de percepção dolorosa, retenção ou incontinência urinária e/ou fecal, de acordo com uma escala funcional numérica (Hayashi et al., 2007). Exames de imagem como radiografias da região de coluna toracolombar foram solicitados e exames laboratoriais quando necessário.

Critérios de inclusão - cães com sinais clínicos de discopatia toracolombar sinais de síndrome medular de graus de 1 a 4 (Coates, 2000; Janssens, 1992; Olby et al., 1994), raças condrodistróficas puras ou mestiças, machos ou fêmeas.

Critérios de exclusão - animais que apresentavam sinais clínicos de DDIV toracolombar de origem traumática, com suspeita de doenças inflamatórias ou infecciosas concomitantes, com sinais de mielomalácia ascendente e que não puderam comparecer na sequência das sessões de forma adequada.

Tratamento - Os cães foram alocados aleatoriamente, por sorteio, em dois grupos: Grupo EA – cães tratados com eletroacupuntura e Grupo OZO - cães tratados com ozonioterapia.

A eletroacupuntura foi realizada no grupo EA utilizando o aparelho de eletroestimulação EL-608 NKL® (Processo FAPESP 2018/06769-8). Foi realizada a frequência mista de 3 Hz alternado com 100 Hz durante 20 minutos, nos pontos B20 (Bexiga 20 ou Pi-Shu), B23 (Bexiga 23 ou Shen-Shu), B60 (Bexiga 60 ou Kun-lun), E36 (Estômago 36 ou Hou-san-li), R3 (Rim 3 ou Tai chi). No ponto *Bai Hui* lombar foi realizado agulhamento seco (Xie e Preast, 2011). Foram utilizadas agulhas de acupuntura de aço inoxidável com dimensões de 0,25X30mm.

Os animais do grupo OZO foram submetidos ao tratamento com a mistura oxigênio-ozônio na concentração de 20 µg/mL, sendo que o volume aplicado em cada ponto foi 3 mL. Os pontos de acupuntura usados foram o B20 e B23 (localizados na região paravertebral), *Bai Hui* lombar, E36 e no espaço entre o ponto R3 e B60. O gerador de ozônio utilizado foi o MedPlus V (Philozon®) (Processo FAPESP 2018/06769-8), o qual, para o seu funcionamento, deve estar interligado com uma fonte de oxigênio medicinal para a produção da mistura gasosa O₂-O₃. Para a coleta do ozônio, foi utilizada uma torneira de três vias ligada a uma unidade filtrante estéril Philozon® com 0,22 micras de poro para minimizar a possibilidade de contaminação do gás em uma aplicação parenteral. A coleta foi realizada com seringas de 10 ou 20 mL da marca Terumo® com material livre de látex e que possui pistão e a lubrificação com silicone, pois são materiais com pouca reatividade com o ozônio (Bocci, 2005). Para a aplicação nos pontos de acupuntura foi utilizada agulha hipodérmica 13x 0,30 ou scalp nº 27, para minimizar a dor local na hora da aplicação.

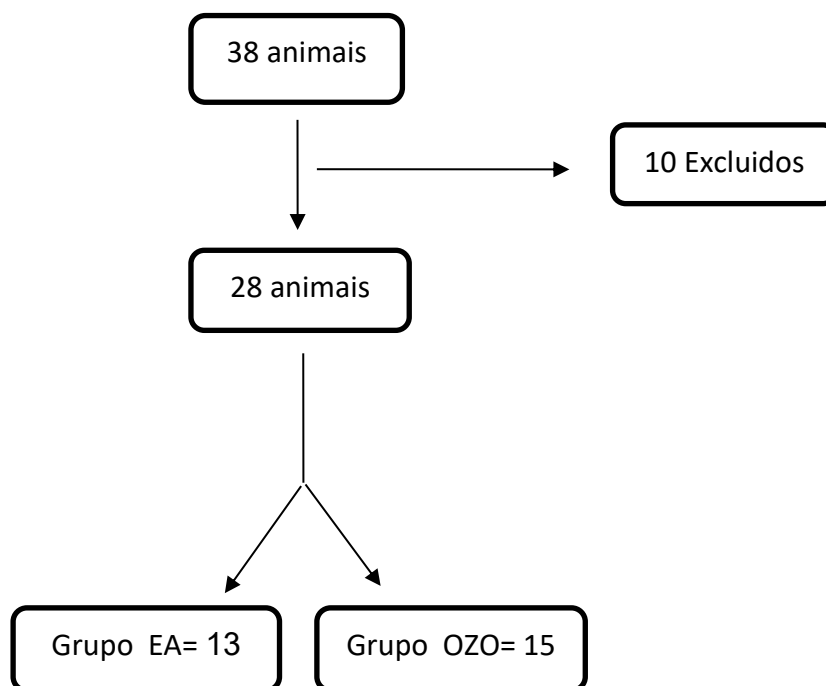
Análise estatística -O nível de significância adotado foi de 5%. Para amostras não paramétricas e comparação de duas médias foi aplicado o teste de Mann Whitney. Para medidas repetidas de amostras não paramétricas e comparação de várias médias foi

aplicado o teste de Friedman. Para medidas repetidas de amostras paramétricas e comparação de várias médias, foi utilizado o teste de Tukey-Kramer. Foi utilizado o programa estatístico Graph-Pad Instat®.

3.3. RESULTADOS

Durante o período de agosto de 2018 a março de 2020, foram atendidos 38 animais de acordo com sinais clínicos de discopatia toracolombar, porém 10 animais tiveram que ser excluídos por não comparecerem às sessões seriadas (n=3), uma desistência, um animal tinha extrusão de disco intervertebral traumática devido atropelamento, três animais saíram dos critérios de inclusão do grupo pois no dia 0 não apresentavam dor ou também tinham lesão mais evidente em outra localização da coluna diferente da região toracolombar, um cão apresentava doença inflamatória encefálica e convulsões, não permitindo uma avaliação correta do tratamento e houve um caso de óbito durante o tratamento (Figura 7).

Figura 7: Fluxograma dos cães atendidos durante o período de agosto de 2018 a março de 2020 – FMVZ-USP.



Dentre os 38 cães com discopatia toracolombar incluídos neste estudo, 14 eram machos (50%) e 14 fêmeas (50%). A idade média foi de $6,1 \pm 2,4$ anos variando de 2 a 11 anos. O peso médio foi de $6,6 \pm 3$ kg, sendo o mínimo 2,4 kg e o máximo de 13,8 kg. O tempo de evolução variou de 2 a 33 dias, com a média de $11,4 \pm 8,3$ dias. A raça mais acometida foi o mestiço condrodistrófico (n=12), seguido do Lhasa Apso (n=5) e depois do Shih Tzu e Dachshund (n=4), Yorkshire (n=2) e Maltês (n=1).

Comparando-se as características dos animais entre os grupos EA e OZO, não foram encontradas diferenças significativas entre tempo de evolução ($p=0,09$), embora o grupo EA ($8,2 \pm 5,9$ dias) apresentou um tempo de evolução menor do que o do grupo OZO ($13,4 \pm 9,5$ dias). Também não houve diferença significativa em relação a idade em anos (EA $6,1 \pm 1,9$; OZO $6,5 \pm 3,2$, $p>0,9$), peso (EA $6,6 \pm 2,0$; OZO $6,2 \pm 3,7$, $p=0,2$), sexo (macho EA 18%, OZO 32%; fêmea EA 29%, OZO 21%, $p=0,4$), nota de dor no dia 0 - DIVAS (EA $3,9 \pm 2,5$; OZO $3,2 \pm 2,9$, $p=0,5$). Com relação aos graus de lesão, não houve discrepâncias entre os grupos: grau 1 (EA 1; OZO 0); grau 2 (EA 4; OZO 7); grau 3 (EA 1; OZO 2); grau 4 (EA 7; OZO 6). O tempo de retorno a locomoção em dias (EA $10,6 \pm 5,4$; OZO $14,5 \pm 15,7$, $p=0,9$) e o EFN no dia 0 (EA $13,1 \pm 6,73$; OZO $15,7 \pm 5,4$, $p=0,2$) também não apresentaram diferenças significativas.

Comparando o escore de avaliação de dor (DIVAS) dos grupos EA e OZO em diferentes momentos, não apresentou diferença significativa entre os grupos (Tabela 1). Entretanto, quando comparado no mesmo grupo com relação aos diferentes momentos houve diferença significativa tanto no grupo EA ($p<0,0001$) como no Grupo OZO ($p<0,0001$), demonstrando a melhora com ambos os tratamentos

Tabela 1: Comparação do escore de avaliação de dor (DIVAS) em diferentes momentos e entre os grupos EA e OZO (nível de significância $p<0,05$) - FMVZ-USP

DIAS	Grupo EA (n=13)	Grupo OZO (n=15)	p valor ^a
0	$3,9 \pm 2,5$	$3,2 \pm 2,9$	$p=0,5$
7	$1,4 \pm 1,8$	$1,2 \pm 1,7$	$p=0,7$
14	$0,8 \pm 1,7$	$0,5 \pm 1,1$	$p=0,6$
21	$0,6 \pm 1,1$	0	-
ALTA	$0,2 \pm 0,8$	$0,06 \pm 0,2$	$P=0,9$
Pvalor ^b	$P<0,0001$	$P<0,0001$	

^ateste não paramétrico Mann-Whitney para comparação de duas médias

^bteste comparação entre medidas repetidas não paramétrico Friedman

Comparando a escala funcional numérica (EFN) dos grupos EA e OZO em diferentes momentos, não apresentou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, quando comparada no mesmo grupo com relação aos diferentes momentos houve diferença significativa tanto no grupo EA ($p < 0,0001$) como no grupo OZO ($p < 0,0001$), demonstrando a melhora neurológica com ambos os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição da Escala Funcional Numérica (EFN) em diferentes momentos e comparação entre os momentos e entre os grupos EA e OZO- FMVZ-USP

DIAS	Grupo EA (n=13)	Grupo OZO (n=15)	p valor ^a
0	13,1 ± 6,7	15,7 ± 5,4	p=0,3
7	16,7 ± 5,5	19,3 ± 3,7	p=0,2
14	19,3 ± 3,1	19,9 ± 2,7	p=0,5
21	20,6 ± 2,2	20,7 ± 1,8	p=0,8
ALTA	21,3 ± 2,5	21,8 ± 1	p=0,7
Pvalor ^b	P<0,0001	P<0,0001	

^ateste não paramétrico Mann-Whitney para comparação de duas médias (dados na mesma linha)

^bteste de comparação de medidas repetidas não paramétrico Friedman (dados na mesma coluna)

Houve diferença significativa (p valor) nas médias do escore obtido da EFN no dia 0 entre os cães de grau 1 e 2 ($20,1 \pm 2,3$) e graus 3 e 4 ($9,5 \pm 3,6$), justificando agrupar os dados destes animais com grau 1 e 2 e outro grupo com graus 3 e 4, com a finalidade de comparar a EFN e o DIVAS.

Comparando a escala funcional numérica (EFN) dos grupos EA e OZO em diferentes momentos em animais que apresentaram grau neurológico 1 e 2, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 3). Porém, quando comparada no mesmo grupo com relação aos diferentes momentos houve diferença significativa tanto no grupo EA ($p=0,01$) como no OZO ($p=0,002$), demonstrando a melhora neurológica com ambos os tratamentos.

Tabela 3: Distribuição da escala funcional numérica (EFN) em diferentes momentos e comparação entre os momentos e entre os grupos EA e OZO em cães com grau de lesão 1 e 2 - FMVZ-USP

DIAS	Grupo EA (n=5)	Grupo OZO (n=7)	P valor ^a
0	20 ± 3,4	20,5 ± 1,8	p=0,9
7	21 ± 1,1	21,7 ± 0,9	p=0,5
14	21,8 ± 0,9	21,7 ± 0,9	p=0,9
21	22,1 ± 0,8	22 ± 1	p=0,9
ALTA	22,6 ± 0,8	22,4 ± 1,1	p=0,8
P valor ^b	p=0,01	p=0,002	

^ateste não paramétrico Mann Whitney para comparação 2 médias (medidas na mesma linha)

^bteste não paramétrico para medidas repetidas e comparação de várias médias Friedman test (medidas na mesma coluna).

Comparando a escala funcional numérica (EFN) dos grupos EA e OZO em diferentes momentos em animais que apresentavam grau neurológico 3 ou 4 não apresentou diferença significativa entre os grupos. No entanto, quando comparada no mesmo grupo com relação aos diferentes momentos houve diferença significativa tanto no grupo EA ($p < 0,0001$) como no grupo OZO ($p < 0,0001$), demonstrando a melhora com ambos os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição da escala Funcional Numérica (EFN) em diferentes momentos e comparação entre os momentos e entre os grupos EA e OZO em cães com grau de lesão 3 e 4- FMVZ-USP

DIAS	Grupo EA (n=8)	Grupo OZO (n=8)	Pvalor ^a
0	8,9 ± 4	11,5 ± 3,6	p=0,1
7	13,8 ± 5,1	17,1 ± 3,9	p=0,2
14	17,8 ± 3	18,3 ± 2,9	p=0,5
21	19,6 ± 2,3	19,6 ± 1,7	p=0,4
ALTA	20,5 ± 2,9	21,3 ± 0,9	p=0,8
Pvalor	$p < 0,0001$ ^b	$P < 0,0001$ ^c	

^ateste não paramétrico Mann Whitney para comparação 2 médias (medidas na mesma linha)

^bteste não paramétrico para medidas repetidas e comparação de várias médias Friedman test (medidas na mesma coluna)

^cteste paramétrico para medidas repetidas e comparação de várias médias Tukey-Kramer

Foram comparadas as médias de retorno a locomoção, em dias, entre os grupos EA ($10,6 \pm 5,4$) e OZO ($14,5 \pm 15,7$) nos cães de graus 3 e 4, não havendo diferença significativa ($p=0.9$), teste de Mann-Whitney.

Dois animais do grupo OZO tiveram recidiva do quadro durante o período do estudo, um da raça Shih Tzu que inicialmente foi atendido com o grau 2 e após 7 meses retornou ao hospital com recidiva, porém com lesão de grau 5, sem dor profunda, não podendo ser incluído no estudo. O outro caso de recidiva foi um cão da raça Lhasa Apso que inicialmente apresentou lesão toracolombar grau 4, retornou após 5 meses com lesão grau 3, podendo ser incluído no estudo e novamente ser sorteado e realizado o tratamento no grupo OZO. A taxa de recidiva durante o período do estudo foi de 0% no grupo EA e 13,3% no grupo OZO.

3.4. DISCUSSÃO

A discopatia intervertebral (DDIV) toracolombar é uma das afecções neurológicas mais comuns na rotina veterinária. Este estudo propôs comparar duas técnicas de tratamento dessa afecção, sendo a eletroacupuntura uma técnica integrativa já reconhecida como efetiva em controlar a dor e acelerar a recuperação motora e sensorial nos casos de discopatias (Cheng et al., 2015; Dragomir et al., 2021; Han et al., 2010; Hayashi et al., 2007; Joaquim et al., 2010, Lai et al., 2008; Laim et al., 2009; Lin e Chen, 2019; Lin e Liu, 2015; Tsai et al., 2015) e a ozonioterapia está surgindo como uma nova alternativa para tratamento como demonstrado em alguns relatos e estudos clínicos em humanos e animais (Apuzzo et al., 2016; Avilés, 2013; Ballardini, 2005; Biazzo et al., 2016; Bocci et al., 2015; Han et al., 2007; Jang et al., 2009; Magalhães et al., 2012; Muto et al., 2016; Oliveira Junior e Lages, 2012; Steppan et al., 2010; Sumida et al., 2019; Vigliani, et al., 2005).

Primeiramente, demonstrou-se que de acordo com as características dos animais atendidos, como raça, idade, peso, sexo, graus de lesão neurológica, os grupos EA e OZO foram homogêneos, o que permite a comparação entre os grupos durante a evolução do tratamento.

Observou-se uma resposta rápida nas duas primeiras semanas dos dois grupos, tanto na avaliação da dor, através do DIVAS, quanto ao retorno neurológico avaliado pelo EFN. No entanto, a partir da terceira semana obteve uma estabilidade de melhora. A

mesma resposta foi observada em outro estudo que comparou eletroacupuntura com acupuntura em cães com discopatia toracolombar, embora com frequência de 20Hz (Lin e Chen, 2019). Portanto, tanto a eletroacupuntura como o ozônio promoveram um rápido controle de dor e reabilitação motora. Outras pesquisas corroboram com os efeitos do ozônio no controle da dor e inflamação aguda (Avilés, 2013; Ceccherelli et al., 1998; Han et al., 2007; Teixeira et al., 2013).

Evidenciou-se uma mudança no padrão de raças mais acometidas com a discopatia toracolombar. Enquanto em trabalhos anteriores de discopatia, a raça mais acometida era o Dachshund (Hayashi et al., 2007; Jeffery et al., 2016; Lin e Chen, 2019; Liu e Lin, 2015; Zidan et al., 2018), neste trabalho atual ocorreu uma maior incidência de raças como o Lhasa Apso e Shih Tzu, os quais apresentaram uma reabilitação motora mais tardia comparados com as outras raças, e os dois animais que apresentaram recidiva foram dessas raças. Considera-se que houve um aumento da população dessas raças no país que sedia o estudo nos últimos anos e por consequência uma quantidade maior de raças mestiças na amostra dos animais atendidos no hospital escola. O mesmo ocorreu com o estudo de Han et al. (2010), relatando uma maior incidência da DDIV em cães da raça Pequinês, seguido do Shih tzu, raças comuns na região da Coreia.

Neste trabalho os animais tratados com eletroacupuntura retornaram mais precocemente a locomoção (10,6 dias), com médias semelhantes a outro estudo com eletroacupuntura 10,1 dias (Hayashi et al., 2017) e 15,15 dias (Han et al., 2010). Em contrapartida, estudos com descompressão cirúrgica, obtiveram tempo médio de retorno a locomoção de 10,8 dias (Ferreira et al., 2002) e 12,9 dias (Davis e Brown, 2002) e 10,2 dias (Yovich, et al., 1994). Por outro lado, estudos com tratamento cirúrgico de fenestração do disco intervertebral revelou um tempo de retorno a locomoção de 20,6 dias (Padilha Filho e Selmi, 1999) semelhante ao tratamento conservador, 20,8 dias (Hayashi et al., 2007).

O mecanismo dessa melhora precoce pode estar relacionado aos achados de algumas pesquisas que avaliaram os efeitos da EA liberando fatores neurotróficos e podem explicar os mecanismos que estimulam a plasticidade neuronal, melhorando o microambiente na medula óssea afetada e na diminuição das lesões secundárias. Isso pode ocorrer através da redução de apoptose neuronal, diminuição do inibidor de crescimento de neurite Nogo-A (inibindo a expressão de RhoA) e da expressão proteica no local da lesão da medula, o que pode promover o reparo tecidual e a recuperação funcional neurológica (Wu et al., 2015). Yang et al. (2016) observou que a EA pode estimular o

aumento da atividade da acetilcolinesterase em lesão induzida em ratos, o número de neurônios médios e grandes no corno anterior da medula espinhal e a expressão de mRNA do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), promovendo uma recuperação da função do neurônio motor no corno anterior da medula. Estudo em gatos submetidos a ganglionectomia parcial da raiz de gânglio dorsal observou um aumento na expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em gânglio da raiz dorsal após EA. Este fator é descrito como neuroprotetor, aumenta a proliferação de progenitores de oligodendrócitos e acelera a remielinização (Sun et al., 2008). Outro fator neurotrófico estimulado pela EA foi estudado por Hayashi et al. (2013), que observou níveis elevados da proteína S100 β no líquido de cães que sofreram lesão medular. A EA estimulou a produção dessa proteína no líquido de cães que tiveram lesão toracolombar e apresentaram recuperação motora tardia, sugerindo sua ação na plasticidade neuronal. Estes fatores neurotróficos estimulados pela EA podem explicar e corroboram com os resultados clínicos encontrados no presente trabalho.

A EA também tem sido demonstrada com eficácia para o controle de dor. Artigos em cães com discopatia toracolombar utilizaram-se baixas frequências com 2- 15 Hz demonstrando eficácia (Han et al., 2010; Joaquim et al., 2010) e frequência intermitente de 20 Hz (Lin e Chen, 2019; Lin e Liu, 2015). Em baixas frequências (2–10 Hz), endorfinas e encefalinas são principalmente liberadas, além de mecanismos colinérgicos noradrenérgicos e muscarínicos que são recrutados. Em frequências mais altas (50–100 Hz), o opioide primário liberado é a dinorfina e são recrutados mecanismos colinérgicos muscarínicos e GABAérgicos para ajudar a mitigar a sinalização nociceptiva. É provável que o fornecimento de outros agentes de alívio da dor em frequências mais altas junto com a EA em baixa frequência possa ter um efeito aditivo (Dewey e Xie, 2021). Neste trabalho foi utilizada uma frequência mista de 3 e 100 Hz utilizada por Hayashi et al. (2007), obtendo controle de dor e retorno da locomoção. Portanto, o uso de frequências mais altas do que as descritas nos trabalhos anteriores (Han et al., 2010; Joaquim et al., 2010) alternadas com frequências baixas podem produzir um efeito analgésico maior do que seria possível com o uso de apenas frequência baixa ou somente alta.

Este estudo confirmou os achados de tempo de retorno a locomoção encontrados em trabalhos anteriores em que foi utilizada a eletroacupuntura no tratamento de cães com DDIV toracolombar. As médias de retorno a locomoção encontradas foram muito parecidas com estudos anteriores em que foram utilizados a mesma frequência e tempo.

Este protocolo que utilizou frequências baixa e alta (Hayashi et al., 2007), está bem estabelecido pois permitiu a reprodutibilidade de resultados anteriores

Nos estudos avaliando os efeitos da eletroacupuntura em discopatias em cães são utilizados uma grande variedade de pontos de acupuntura, escolhidos segundo a função energética de acordo com a medicina tradicional chinesa ou dependendo da localização da lesão. Utilizaram pontos locais da bexiga (Han et al., 2010; Hayashi et al., 2007; Joaquim, et al., 2010) ou hua tuo jia ji (Lin e Chen, 2019; Liu e Lin, 2015) e pontos distais Bai Hui lombar (Hayashi et al., 2007; Lin e Chen, 2019), VB30, VB34, VG3, VG7, E36, IG4, F3, R3, B60, Liu Feng (Han et al., 2010; Hayashi et al., 2007; 2013; Joaquim, et al., 2010, Lin e Chen, 2019; Liu e Lin, 2015), e abertura do Vaso Governador (VG) com ID3, B62 (Hayashi et al., 2007) e pontos locais da extrusão no meridiano do VG, VG4 e VG5 (Hayashi et. 2013). Os pontos utilizados neste trabalho (B20, B23, Bai Hui lombar, E36 e R3/B60) foram também descritos em trabalhos anteriores (Han et al., 2010; Hayashi et al., 2007; Joaquim, et al., 2010). Embora os autores utilizassem diferentes protocolos, com alguns conjuntos de pontos iguais, todos obtiveram resultados positivos.

No presente trabalho a concentração de ozônio em cada ponto de acupuntura foi 20 µg/mL, no volume de 3mL, provocando leve a moderado desconforto nas primeiras aplicações em alguns animais, porém demonstrou-se segura e eficaz, não apresentando nenhum incidente de infecção ou abscesso local.

Em humanos, a concentração de ozônio descrita por Bocci et al. (2005) e Borrelli (2011) foi de 18-20 µg/mL a 25 µg/mL, pois concentrações superiores a 20 µg/mL podem causar dor local durante a aplicação, principalmente nos tratamentos iniciais. Após cinco a sete tratamentos, o limiar de dor aumenta e a concentração do ozônio pode ser aumentada aos poucos. Na medicina veterinária, Teixeira et al. (2013) compararam os efeitos da ozonioterapia em pontos de acupuntura (30µg/mL, 0,5mL), aplicação retal (30µg/mL, 10 mL) e aplicação de antiinflamatório não esteroideal no pós-operatório de cadelas submetidas a ovariectomia (OH). Obtendo analgesia em 24 horas nos 3 grupos e não havendo diferença significativa, no grupo em que ozônio foi aplicado em pontos de acupuntura, dois animais precisaram de resgate analgésico. O ozônio não teve efeitos adversos mensuráveis e foi uma boa opção para promover o alívio da dor. Entretanto, Avilés et al. (2013) relatou a aplicação de ozônio em 15 cães entre 2 e 12 anos com sinais de claudicação, sensibilidade em coluna e extremidades, na concentração de 8µg/mL, volume de 2 a 5 mL em pontos doloridos e repetiu a aplicação por 3 a 6 dias. A

dor desapareceu em mais da metade dos casos em 24 horas, encontrando uma melhora de 93% apenas com a aplicação do gás. Esses estudos demonstraram os efeitos positivos da aplicação da ozonioterapia local, no ponto de acupuntura e sistêmica (insuflação retal) em animais, porém com doses diferentes da utilizada no presente estudo.

Ceccherelli et al. (1998) avaliaram a aplicação de ozônio em diferentes concentrações (10 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL- 0,5 mL) em ratos em que foram induzidos dor e edema por capsaicina. O Ozônio foi aplicado no membro ipsilateral e contralateral, 30 minutos antes da administração de 50 µg de capsaicina diluído em 50 microlitros de solução fisiológica. A aplicação contralateral da mistura O₂-O₃ modulou a resposta do edema na pata, sendo apenas responsivo a dose de 20 µg/ mL e nenhuma eficácia foi encontrada para as concentrações de 10 e 30 µg / mL. Outro estudo feito por Niu et al. (2018), compararam o efeito terapêutico de concentrações de 20, 40 e 60 µg/mL aplicados no espaço intradiscal em casos de hérnia discal lombar em 80 pacientes humanos. Foram analisadas a tomografia computadorizada, EVA (escala visual analógica), níveis de IL-6, atividade de SOD (Superóxido dismutase), IgM e IgG pela técnica ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) na admissão, após 6 e 12 meses. Todos apresentaram retração discal, porém nos pacientes em que foi utilizada a concentração de 40 µg / mL, houve uma maior taxa de retração do disco. Os níveis de IL-6, IgM, IgG e EVA diminuíram significativamente, enquanto a atividade de SOD que reflete a capacidade antioxidante do corpo e protege contra a lesão do sistema imunológico celular, aumentou entre todos os grupos ao longo do tempo. As concentrações baixas de ozônio medicinal (20 µg / mL e 40 µg / mL) reduziram a expressão sérica de IL-6, IgG e IgM, apresentando efeitos analgésicos e antiinflamatórios, enquanto a alta concentração de ozônio medicinal (60 µg / mL) aumentou a expressão sérica de IL-6, IgG, IgM, apresentando-se como dor e efeitos pró-inflamatórios. No entanto, não foi relatado qual o volume aplicado intradiscal de cada concentração. Esses achados corroboram com o efeito antiinflamatório e analgésico de 20 µg/mL utilizados neste estudo pois, embora em alguns animais a dose utilizada possa ter causado um desconforto leve na aplicação, o efeito terapêutico foi eficiente havendo um bom controle da dor. Mais estudos são necessários para comparar diferentes concentrações e volumes de ozônio aplicados nos pontos de acupuntura, local ou sistêmica e verificar qual a dose ideal para atingir o objetivo terapêutico.

Estudos utilizando a ozonioterapia no tratamento de discopatias em cães foram descritos. Han et al. (2007), relataram a aplicação percutânea de O₂-O₃ intradiscal guiado por fluoroscópio usando a concentração de 32µg/mL, 1,5 a 2mL em cinco cães com discopatia na região toracolombar. Após cinco semanas do tratamento, o tamanho médio dos discos herniados foi medido por tomografia computadorizada e mostrou redução significativa dos volumes de disco em todos os animais. O grau de encolhimento foi linearmente correlacionado negativamente com a mineralização do disco. Todos os cinco cães recuperaram sua função de marcha e não apresentaram recidiva. Jang et al. (2009) descreveram a aplicação de ozônio intradiscal transoperatório em um cão da raça Shih-tzu, de 6 anos de idade, apresentando tetraplegia progressiva. Ao exame de ressonância magnética, observou-se uma compressão da medula espinhal nos espaços C4-C5, C5-C6 e C6-C7. O O₂-O₃ foi aplicado no período intraoperatório, na concentração de 25 µg/mL, 2 mL, nos espaços intervertebrais C4-C5 e C6-C7 e realizou-se uma cirurgia de descompressão ventral no espaço intervertebral C5-C6. Após o procedimento, não apresentou mais dor cervical e três semanas após a cirurgia, demonstrou-se completa resolução dos déficits neurológicos. Após dois meses da cirurgia, as imagens de ressonância magnética evidenciaram que os materiais de hérnia de disco de C5 - C6 e C6 - C7 foram completamente removidos e o de C4 - C5 notavelmente reduzido. No presente estudo, não foi possível avaliar se houve redução do volume do disco intervertebral após o ozônio ou eletroacupuntura, pois não foram realizados exames de imagem avançado pré e pós-tratamento.

Os músculos paravertebrais são usados como uma rota para a infiltração de O₂-O₃. As injeções de O₂-O₃, quer intradiscal ou nos músculos paravertebrais, apresentam evidências tanto para a terapia de ozônio aplicada via intradiscal quanto para a terapia de ozônio aplicada no músculo paravertebral e periforaminal para o alívio da dor a longo prazo (Bocci et al., 2015, Borrelli., 2011). Usou -se o ozônio paravertebral em pontos de acupuntura nos cães do estudo por ser uma via de fácil acesso, somado ao estímulo do acuponto com o intuito de potencializar o efeito.

Apuzzo et al. (2016), relataram um caso de lombociatalgia direita em uma mulher que foi submetida a 12 aplicações de O₂-O₃ (concentração de 20 µg /mL), duas vezes por semana, na região intramuscular paravertebral em L5-S1, porém sem relatar volume total aplicado. Houve remissão moderada da dor, embora os déficits motores persistissem, foi realizado o tratamento cirúrgico, onde foram coletados os fragmentos do disco L5-S1. Na avaliação histológica foi observada a ausência de reação inflamatória, a perda de água e

proteoglicanos, associados ao aumento das fibras colágenas. Sugere-se que O₂-O₃ paravertebral teve a ação de regeneração do anel fibroso de hérnia discal e redução do processo inflamatório, mas não apresentou redução do volume discal.

Uma meta-análise publicada por Steppan et al. (2010), foi realizada para determinar os efeitos em relação à dor, função e taxa de complicações do tratamento com O₂-O₃ em discopatias lombares em pessoas. As meta-análises separadas foram realizadas para escala analógica visual (EVA), índice de incapacidade de Oswestry (ODI) e escalas de resultado de MacNab modificadas, bem como para a taxa de complicações. Doze estudos onde 8 mil pacientes de vários centros foram avaliados. Houve melhora estimada da dor e da função em pacientes com idade entre 13 e 94 anos com todos os tipos de hérnias de disco. Os resultados da dor e da função são semelhantes aos resultados obtidos em discos lombares tratados com discectomia cirúrgica, mas com as taxas de complicações e tempo de recuperação significativamente menores. Uma outra meta-análise e revisão sistemática de ensaios controlados randomizados realizada por Magalhães et al. (2012), utilizou todos os bancos de dados eletrônicos de 1966 a 2011 para avaliar os resultados terapêuticos da injeção percutânea de ozônio para a dor lombar secundária à hérnia discal. Este estudo indicou que o nível de evidência é II-3 (evidências obtidas a partir de estudos de diagnóstico de incerteza) para a terapia com ozônio aplicado intradiscalmente e II-1 (evidência obtida por pelo menos um estudo de precisão diagnóstica conduzido de amostra adequada) para a terapia com ozônio aplicado no músculo paravertebral e periforaminal trazendo um alívio da dor prolongado, com base nos critérios USPSTF (níveis de evidência com base nos dados de qualidade disponíveis na literatura). A evidência disponível produziu uma força de recomendação de 1C (recomendação forte, mas que pode mudar quando novas evidências de melhor qualidade ficarem disponíveis) para a terapia com ozônio aplicada no disco e 1B (forte recomendação, pode ser indicado na maioria dos pacientes na maior parte das vezes) para o ozônio aplicado nos músculos paravertebrais ou periforaminais. Embora estes estudos sejam em humanos, pode-se extrapolar para a espécie canina, com evidência de recomendação forte de aplicação paravertebral em casos frequentes de hérnia discal em cães.

Biazzo et al. (2016), relataram o uso do ozônio aplicado em regiões lombares paravertebrais intramusculares no tratamento da dor lombar em humanos. A dor local e irradiada foi avaliada usando a escala EVA e o estado funcional e a incapacidade percebidos foram analisados utilizando o índice de incapacidade de ODI, administrado

antes do tratamento e um mês após a última injeção. Os resultados foram: 79% dos pacientes tiveram redução de EVA de 2,3 pontos e todos, exceto um paciente, relataram redução de ODI (média de 9%). Assim, as aplicações de O₂-O₃ paravertebral foram minimamente invasivas, seguras e eficazes para aliviar a dor, bem como para a déficits neurológicos. A vantagem observada foi que esta técnica é de fácil execução, não necessitando de tomografia computadorizada ou anestesia. Para os animais esta vantagem é importante pois permite a aplicação de forma rápida e prática do ozônio nos pontos de acupuntura em ambiente ambulatorial, sem necessidade de acompanhamento por método de imagem durante o procedimento e nem anestesia.

A média de duração do tratamento com EA encontrada em literatura foi de 20 minutos (Hayashi et al., 2007; Joaquim et al., 2010), 25 a 30 min (Han et al., 2010), 15 minutos (Lin e Liu, 2015) e 10 minutos (Lin e Chen, 2019). O presente estudo também realizou a eletroacupuntura em 20 minutos. No entanto houve vantagem quando se aplicou a ozonioterapia, que demonstrou ser mais rápida do que a EA. Além disso, o equipamento gerador de ozônio é de simples manuseio e não há a necessidade de um treinamento longo prévio. Enquanto na eletroacupuntura, é necessário para a aplicação das agulhas, um treinamento prévio mais extenso. A desvantagem da ozonioterapia estaria no alto custo do aparelho e na quantidade maior de insumos específicos para ozonioterapia, para evitar liberação de resíduos nos insumos.

A farmacopuntura ou acupuntura química apresenta um efeito terapêutico maior do que apenas o estímulo da agulha, pois combina a estimulação de pontos de acupuntura e o efeito farmacológico dos medicamentos (Chen et al., 2013; Luna et al., 2008; Teixeira et al., 2013) Existem estudos com aplicação de solução salina, veneno de abelha (Chen et al. 2013; Pontes et al., 2015), vitaminas e fármacos. Estudos de controle de dor pós-operatória em cadelas submetidas a OH compararam a aplicação de micro doses (10% da dose usual) de morfina (0,5mg/kg) e carprofeno (4mg/kg) em pontos de acupuntura (VB34, BP6, E36, F3), com acupuntura e doses normais destes fármacos, não apresentando diferença significativa entre os grupos (Luna et al., 2015). Além disso, a farmacoacupuntura com solução fisiológica e meloxicam em doses usuais (0,1mg/kg) e em microdoses (10% da dose usual) aplicados em dois grupos de seleção em pontos de acupuntura (VG14 versus BP6, VB34, F3 e E36 bilaterais), no pós-operatório de ovariosalpingohisterectomia de gatas, não observou diferença significativa no controle da dor entre os grupos (Sousa, et al., 2012). Portanto, a farmacoacupuntura com 1/10 da dose

usual de diferentes fármacos para o controle da dor pós-operatória obteve a mesma eficácia da dose plena.

Os estudos com veneno de abelha têm comprovado os efeitos positivos da farmacopuntura, como no estudo da aplicação de veneno de abelha nos pontos E36 e E25 que demonstrou efeitos na redução do peso corporal em ratos obesos, havendo diferença na diminuição da fome e no final apresentaram menor peso de gordura perirrenal e abdominal, diminuição dos níveis de colesterol, glicose e triglicérides (Pontes et al., 2015). Por outro lado, a farmacopuntura com veneno de abelha em discopatias toracolombares demonstrou resultados de um retorno mais rápido a locomoção comparando com o grupo controle (Tsai et al., 2015) e corroborando com o uso do ozônio nos pontos de acupuntura para potencialização do efeito. Porém necessita-se ainda de estudos bioquímicos e mais detalhados para entender o correto mecanismo da fisiologia após a farmacopuntura com o ozônio.

No entanto, em um estudo com farmacopuntura em ratos, observou-se a ativação de neurônios que expressam a proteína FOS principalmente na região dorsal do corno da medula espinhal nos segmentos lombares L3–5 após aplicação de fármacos (veneno de abelha, solução fisiológica, vitamina B1 e vitamina B12) no ponto E36. Esse estímulo pode ocasionar uma mudança na configuração espacial dentro do ponto de acupuntura aliado com os efeitos dos substratos injetados, podem ativar a sinalização neuronal, sendo mais intensa com o veneno de abelha (Chen et al., 2014). Similarmente, neste trabalho, os efeitos de plasticidade neural podem ter sido ativados com a aplicação do O₂-O₃ em pontos de acupuntura, tanto na região paravertebral quanto nos pontos distais em que foi utilizado os pontos E36 e o R3/B60.

Outra consideração necessária seria a questão que neste trabalho foi utilizada apenas uma técnica de aplicação local do ozônio, não permitindo usufruir de forma plena os efeitos das técnicas de aplicação sistêmica como a insuflação retal ou auto-hemoterapia menor e maior, que podem modular o stress oxidativo e estimular o sistema imune, podendo ter outros benefícios não atingidos com apenas a aplicação local. A ozonioterapia tem o potencial de tratamento de várias outras afecções sistêmicas, utilizando diferentes vias de aplicação, podendo agir de forma sinérgica. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que compara o efeito da eletroacupuntura versus farmacopuntura com ozônio para o tratamento de cães com sinais de discopatia toracolombar, o que sugere que possa ocorrer uma amplificação do efeito do ozônio por ser aplicado no ponto de acupuntura. Desta forma, embora seja uma abordagem

minimamente invasiva e relativamente segura, mais estudos clínicos são necessários para comprovar a segurança e eficácia, padronizar técnicas, doses e indicações clínicas.

3.5. CONCLUSÃO

A ozonioterapia foi eficaz para a reabilitação motora e sensorial em cães com sinais de discopatia toracolombar à semelhança da eletroacupuntura.

A aplicação do ozônio ocorreu de forma mais rápida que a aplicação da eletroacupuntura, com tempo de contenção reduzido e não necessitando de um treinamento prévio extenso.

A via de aplicação paravertebral e subcutânea demonstrou ter a vantagem de não necessitar de anestesia e de outros métodos de imagem avançada, sendo simples, segura e eficaz.

3.6. REFERÊNCIAS

Apuzzo, D., Ferraza, P., Piscitelli, M., Melengu, E., 2016. A Case of Inflammatory Reduction with Ozone Treatment of Disc Herniation and Histological Changes. *Anat Physiol.* 6:3.

Avilés, M.H., 2013. Use of ozone and ozonated growth factors in musculoskeletal disorders of the canine species. *Revista Española de Ozonoterapia.* 3, 95-98.

Ballardini, E., 2005. Oxygen-Ozone Therapy for Spinal Muscle Disorders in the Horse. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia.* 4, 70-73.

Biazzo, A.; Corriero, A.S.; Confalonieri, N., 2018. Intramuscular oxygen-ozone therapy of low back pain. *Acta Biomed.* 87, 2:000-000

Bocci, V., 2005. *Ozone: A New Medical Drug.* Springer, Netherlands. 259p

Bocci, V., Borrelli, E., Zanardi, I., Travagli, V., 2015. The usefulness of ozone treatment in spinal pain. *Drug, Design, Development and Therapy.* 9, 2677-2685.

Borrelli, E., 2011. Mechanism of Action of Oxygen Ozone Therapy in the Treatment of Disc Herniation and Low Back Pain. *Advances in Minimally Invasive Surgery and Therapy for Spine and Nerves. Acta Neurochirurgica Supplementum.*, 108.

Ceccherelli, F., Gagliardi, G., Faggian, L., Loprete, F., Giron, G., 1998. Analgesic effect of subcutaneous administration of oxygen-ozone. a blind study in the rat on the modulation of the capsaicin-induced edema. *Acupuncture & electro-therapeutics research.* 23, 171-184

Chen C.Y., Lin, C.N., Chern, R.S., Tsai, Y.C., Chang, Y.H., Chien, C.H., 2014. Neuronal activity stimulated by liquid substrates injection at Zusanli (ST36) acupoint: the possible mechanism of aquapuncture. *Evid Based Complement Alternat Med.* 627342.

Cheng, Y., Lin, J., Su, S. H., Shih, P., Chen, K., Wang, H., Lee, W., 2015. Case report: Efficacy of combination of Electroacupuncture and Aquapuncture Using Vitamin B Complex on Promotion of Ambulation Perception in 15 Dogs with Hansen Type I Intervertebral Disc Disease Undergoing Hemilaminectomy. *Thai J Vet Med.* 45, 463-468.

Coates, J. R., 2000. Intervertebral disk disease. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice.* 30,77–110.

Davis, G.J., Brown, D.C., 2002. Prognostic indicators for time to ambulation after surgical decompression in nonambulatory dogs with acute thoracolumbar disk extrusions: 112 cases. *Vet Surg.* 31, 513–518.

Dewey., C.W., XIE, H., 2021. The scientific basis of acupuncture for veterinary pain management: A review based on relevant literature from the last two decades *Open Veterinary Journal.* 11(2): 203-209.

Dragomir, M.F., Pestean, C.P., Melega, I., Danciu, C.G., Purdoiu, R.C., Oana, L., 2021. Current Aspects Regarding the Clinical Relevance of Electroacupuncture in Dogs with Spinal Cord Injury: A Literature Review. *Animals.* 11, 219.

Fenn, J., Olby N.J., Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI)., 2020. Classification of intervertebral disc disease. *Front Vet Sci.* 7:579025.

Ferreira, A.J.A., Correia, J.H.D., Jaggy, A., 2002. Thoracolumbar disc disease in 71 paraplegic dogs: influence of rate of onset and duration of clinical signs on treatment results. *J Small Anim Pract.* 43,158–163.

Han, H.J., Kim, J.Y., Jang, H.Y., Lee, B, Yoon, J.H., Jang, S.K., Choi, S.H., Jeong, S.W., 2007. Fluoroscopic-guided intradiscal oxygen-ozone injection therapy for thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs. *In Vivo.* 21:609-614.

Han, H.J., Yoon, H.Y., Kim, J.Y., Jang, H.Y., Lee, B., Choi, S. H., Jeong, S. W., 2010. Clinical effect of additional electroacupuncture on thoracolumbar disc herniation in 80 paraplegic dogs. *The American Journal of Chinese Medicine.* 38(6): 1015-1025.

Hayashi, A.M., Matera, J. M., Pinto, A. C. B. D. F., 2007. Evaluation of eletroacupuncture treatment for thoracolumbar intervertebral disk disease in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association.* 231, 1-6.

Hayashi, A.M. H., Pinto, A. C.B. D. F., Cortopassi, S. R. G., Marvulle, V., Maximino, J. R., Chadi, G., Matera, J. M., 2013. S100 β levels in CSF of nonambulatory dogs with intervertebral disk disease treated with electroacupuncture. *Journal of Veterinary Medicine.* 1-8.

Jang, H.Y., Lee, J.S., Lee, B., Kim, K.H., Jeong, S.W., 2009. A Case of Intradiscal Oxygen-ozone Injection Therapy for Cervical Herniated Intervertebral Disc in a Dog. *J Vet Clin.* 26 (3): 273-275.

Janssens, L. A. A., 1992. Acupuncture for the treatment of thoracolumbar and cervical disc disease in the dog. *Problems in Veterinary Medicine.* 4, 107-116.

Jeffery, N. D., Barker, A., Alcott, C., Kraus, K. H., Shivapour, S., Scanlin, E., Nicolas Granger, N., Levine, J. M., 2016. Factors associated with recovery from paraplegia in dogs with loss of pain perception in the pelvic limbs following intervertebral disk herniation. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 248, 386-394.

Joaquim, J.G., Luna, S.P., Brondani, J.T., Torelli, S.R., Rahal, S.C., de Paula Freitas, F., 2010. Comparison of decompressive surgery, electroacupuncture, and decompressive

surgery followed by electroacupuncture for the treatment of dogs with intervertebral disk disease with long-standing severe neurologic deficits. *J Am Vet Med Assoc.* 1;236(11), 1225-9.

Lai, A., Chow, D.H., Siu, W.S., Holmes, A.D., Tang, F.H., Leung, M.C., 2008. Effects of electroacupuncture on a degenerated intervertebral disc using in vivo rat-tail model. *Proc.Inst. Mech. Eng.* 222, 241-248.

Laim, A., Jaggy, A., Forterre, F., Doherr, M.G., Aeschbacher, G., Glardon, O., 2009. Effects of adjunct electroacupuncture on severity of postoperative pain in dogs undergoing hemilaminectomy because of acute thoracolumbar intervertebral disk disease. *J Am Vet Med Assoc.*1;234(9):1141-6.

Lascelles, B. D. X., Cripps, P. J., Jones, A., 1998. Efficacy and Kinetics of Carprofen, Administered Preoperatively or Postoperatively, for the Prevention of Pain in Dogs Undergoing ovariohysterectomy. *Veterinary Surgery.* 27, 568–582.

Lin, S.C., Chen, F.P., 2019. Comparison of Acupuncture and Electroacupuncture for the Treatment of Dogs with Thoracolumbar Intervertebral Disc Disease: a Randomized Controlled Trial. *Int J Vet Anim Med.* 2, 1.

Liu, C.M., Lin, C.T., 2015. Retrospective study of a new standardized acupuncture treatment protocol on thoracolumbar spinal cord diseases in 84 dogs. *Pak Vet J.* 35(4), 461-465.

Luna, S.P.L., Angeli, A.L., Ferreira, C.L., Lettry, V., Scognamillo-Szabó, M., 2008. Comparison of Pharmacopuncture, Aquapuncture and Acepromazine for Sedation of Horses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 5.

Luna, S.P., Martino, I.D., Lorena, S.E., Capua, M.L., Lima, A.F., Santos, B.P., Brondani, J.T., Vesce, G., 2015. Acupuncture and pharmacopuncture are as effective as morphine or carprofen for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. *Acta Cir Bras.* 30 (12):831-7.

Magalhães, F.N.O., Dotta, L., Sasse, A., Teixeira, M.J., Fonoff, E.T., 2012. Ozone Therapy as a Treatment for Low Back Pain Secondary to Herniated Disc: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Pain Physician*. 15, E115-E129

Muto, M., Giurazza, F., Silva, R.P., Guarnieri, G., 2016. Rational approach, technique and selection criteria treating lumbar disk herniations by oxygen–ozone therapy. *Interv Neuroradiol*. 22(6):736-740.

Niu, T., Lv, C., Yi, G., Tang, H., Gong, C., Niu, S., 2018. Therapeutic Effect of Medical Ozone on Lumbar Disc Herniation. *Med Sci Monit*. 24:1962-1969.

Olby, N. J., Dyce, J., Houlton, J. E. F. 1994. Correlation of plain radiographic and lumbar myelographic findings with surgical findings in thoracolumbar disk disease. *Journal of Small Animal Practice*. 35, 345-350.

Oliveira Junior, J.O., Lages, G.V., 2012. Ozonioterapia em lombociatalgia. *Rev Dor*. 13, 261-270.

Padilha Filho, J.G., Selmi, A.L., 1999. Retrospective study of thoracolumbar ventral fenestration through intercostal thoracotomy and paracostal laparotomy in the dog. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 36 (4).

Penido, B.R.; Lima, C.A.; Ferreira, L.F.L., 2010. Aplicações da ozonioterapia na clínica veterinária. *PUBVET, Londrina*. 4 (40).

Peteoacă, A., Istrate, A., Goanță, A.M., Ionașcu, I., Tănase, A., 2020. The use of ozone therapy in veterinary medicine: a systematic review. *AgroLife Scientific Journal*. 9(2).

Pontes, M.C., Heck, L.C., Coelho, J. C., 2015. Behavioral and biochemical effects of pharmacopuncture (ST 36 and ST 25) in obese rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.15:297.

Sciorsci, R.L., Lillo, E., Occhiogrosso, L., Rizzo, A., 2020. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. *Research in Veterinary Science*. 130, 240-246.

Shih, A. C., Robertson, S., Isaza, N., Pablo, L. & Davies, W., 2008. Comparison between analgesic effects of buprenorphine, carprofen, and buprenorphine with carprofen for canine ovariohysterectomy. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 35, 69-79.

Sousa, N. R. de, Luna, S. P. L., Cápuá, M. L. B. de, Lima, A. F. da M., Oliveira, F. A. de, Viveiros, B. M. de, Barbosa, L., 2012. Analgesia da farmacopuntura com meloxicam ou da aquapuntura preemptivas em gatas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. *Cienc. Rural* 42 (7).

Steppan, J., Meaders, T., Muto, M., Murphy, K., 2010. A Metaanalysis of the Effectiveness and Safety of Ozone Treatments for Herniated Lumbar Discs. *J Vasc Interv Radiol*. 21:534–548.

Sumida, J.M., Matera, J.M., Hayashi, A.M., 2019. Ozone therapy as pharmacoacupuncture for cervical pain in dogs. In: *Proceedings of the 45th IVAS Annual Congress on Veterinary Acupuncture*, Wroclaw, pp 91.

Sun, W.W., Zhao, W. & Wang, TH., 2008. Effects of Electro-acupuncture on PDGF Expression in Spared Dorsal Root Ganglion and Associated Dorsal Horn Subjected to Partial Dorsal Root Ganglionectomy in Cats. *Neurochem Res*. 33, 437–443.

Teixeira, L.R., Luna, S.P, Taffarel, M.O., Lima, A.F., Sousa, N.R., Joaquim, J.G., Freitas, P.M., 2013. Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. *The Veterinary Journal*. 197, 794-799.

Tsai, L., Lin, Y., Hsieh, C., 2015. Effects of Bee Venom Injections at Acupoints on Neurologic Dysfunction Induced by Thoracolumbar Intervertebral Disc Disorders in Canines: A Randomized, Controlled Prospective Study. *BioMed Research International*. 2015, 1-7.

Vigliani, A., Boniperti, E., Scudo, E., 2005. Paravertebral O₂–O₃ Treatment in Mechanical Lumbar Pain in Riding Horses. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia*. 4: 64-69.

Xie, H., Preast, V., 2011. Acupuntura Veterinária Xie. MedVet 2011. 363 p.

Wu, N., Zhang, S., Liu, J., Zhu, Q., Gu, R., 2015. Neuroprotective effects of electroacupuncture on early- and late-stage spinal cord injury. Neural Regen. Res. 10(10): 1628-1634.

Yang, J.H., Lv, J.G., Wang, H., Nie, H.Y., 2015. Electroacupuncture promotes the recovery of motor neuron function in the anterior horn of the injured spinal cord. Neural Regen Res. 10(12):2033-2039.

Yovich, J.C., Read, R., Eger, C., 1994. Modified lateral spinal decompression in 61 dogs with thoracolumbar disc protusion. J Small Anim Pract. 35, 351–356.

Zidan, N., Fenn, J., Griffith, E., Early, P.J., Mariani, C.L., Muñana, K.R., Guevar, J., Olby, N.J., 2018. The Effect of Electromagnetic Fields on Post-Operative Pain and Locomotor Recovery in Dogs with Acute, Severe Thoracolumbar Intervertebral Disc Extrusion: A Randomized Placebo-Controlled, Prospective Clinical Trial. J Neurotrauma. 1;35(15):1726-1736.

4. CONCLUSÃO GERAL

A eletroacupuntura e a farmacopuntura com ozônio obtiveram uma resposta clínica na melhora da dor e retorno da locomoção de forma eficiente. Pode-se concluir que a ozonioterapia é um tratamento eficaz, seguro e de rápida aplicação, com efeitos semelhantes à eletroacupuntura em casos de discopatia intervertebral toracolombar em cães condrodistróficos ou raças mestiças.

A ozonioterapia demonstra ter potencial para o tratamento de várias afecções sistêmicas e complexas, através da escolha de diferentes vias de aplicação, pois podem ou não ter efeito sinérgico. Embora seja uma abordagem minimamente invasiva e relativamente segura, mais estudos clínicos são necessários para comprovar a segurança e eficácia, padronizar técnicas, doses e indicações clínicas.

5. FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2018/06769-8.

6. REFERÊNCIAS (GERAL)

APUZZO, D.; FERRAZA, P.; PISCITELLI, M.; MELENGU, E. A Case of Inflammatory Reduction with Ozone Treatment of Disc Herniation and Histological Changes. *Anat Physiol.*, v.6, n.3, 2016.

AVILÉS, M.H. Use of ozone and ozonated growth factors in musculoskeletal disorders of the canine species. *Revista Española de Ozonoterapia.*, v.3, n.1, p. 95-98, 2013.

BALLARDINI, E. Oxygen-Ozone Therapy for Spinal Muscle Disorders in the Horse. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia.*, v. 4, p. 70-73, 2005.

BIAZZO, A.; CORRIERO, A.S.; CONFALONIERI, N. Intramuscular oxygen-ozone therapy of low back pain. *Acta Biomed.*, v. 89, n. 1, p. 41-46, 2018.

BOCCI, V. Ozone: A New Medical Drug. Springer, Netherlands. 259p, 2005.

BOCCI, V.; BORRELLI, E.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. The usefulness of ozone treatment in spinal pain. *Drug, Design, Development and Therapy.*, v.9, p. 2677-2685, 2015.

BRAUND, K. G. Clinical syndromes in veterinary neurology. USA: Willianms e Wilkins. 257 p. 1986.

CHENG, Y.; LIN, J.; SU, S. H.; SHIH, P.; CHEN, K.; WANG, H.; LEE, W. Case report: Efficacy of combination of Electroacupuncture and Aquapuncture Using Vitamin B Complex on Promotion of Ambulation Perception in 15 Dogs with Hansen Type I Intervertebral Disc Disease Undergoing Hemilaminectomy. *Thai J Vet Med.*, v. 45, n. 3, p. 463-468, 2015.

COATES, J. R. Intervertebral disk disease. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice.*, v. 30, n. 1, p. 77–110, 2000.

DEWEY., C.W., XIE, H., 2021. The scientific basis of acupuncture for veterinary pain management: A review based on relevant literature from the last two decades *Open Veterinary Journal.*, v.11, n. 2, p. 203-209, 2021.

HAN, H.J.; KIM, J.Y.; JANG, H.Y.; LEE, B.; YOON, J.H.; JANG, S.K.; CHOI, S.H.; JEONG, S.W. Fluoroscopic-guided intradiscal oxygen-ozone injection therapy for thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs. *In Vivo.*, v.21, p. 609-614, 2007.

HAN, H.; YOON, H.; KIM, J. JANG; H. LEE, B.; CHOI, S. H.; JEONG, S. Clinical effect of additional electroacupuncture on thoracolumbar disc herniation in 80 paraplegic dogs. *The American Journal of Chinese Medicine.*, v.38, n.6, p.1015-1025, 2010.

HAYASHI, A.M.; MATERA, J.M. Princípios gerais e aplicações da acupuntura em pequenos animais: revisão de literatura. *Revista de Educação continuada do CRMV-SP.*, v. 8, n. 2, p. 109–122, 2005.

HAYASHI, A. M.; MATERA, J. M.; FONSECA PINTO, A. C. B. D. Evaluation of eletroacupuncture treatment for thoracolumbar intervertebral disk disease in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association.*, v. 231, n. 6, p. 1-6, 2007.

HAYASHI, A.M. H.; PINTO, A. C.B. D. F.; CORTOPASSI, S. R. G.; MARVULLE, V.; MAXIMINO, J. R.; CHADI, G.; MATERA, J. M. S100 β levels in CSF of nonambulatory dogs with intervertebral disk disease treated with electroacupuncture. *Journal of Veterinary Medicine.*, v. 2013, p. 1-8, 2013.

FENN, J.; OLBY N.J.; the Canine Spinal Cord Injury Consortium (CANSORT-SCI) Classification of intervertebral disc disease. *Front Vet Sci.*, 7:579025, 2020.

FERGUNSON, B. Técnicas de Acupuntura Veterinária e Moxabustão. In: XIE, H.; PREAST, V. *Acupuntura Veterinária Xie*. Brasil: Ed MedVet. 2011. p.339.

JANG, H.Y.; LEE, J.S.; LEE, B.; KIM, K.H.; JEONG, S.W. A Case of Intradiscal Oxygen-ozone Injection Therapy for Cervical Herniated Intervertebral Disc in a Dog. *J Vet Clin.*, v. 26, n.3, p. 273-275, 2009.

JANSSENS, L. A. A. Acupuncture for the treatment of thoracolumbar and cervical disc disease in the dog. *Problems in Veterinary Medicine.*, v. 4, n. 1, p. 107-116, 1992.

JERRAM, R. M.; DEWEY, C. W. Acute thoracolumbar disk extrusion in dogs – Part I. *Compendium on Continuing Education for the Practice Veterinary.*, v. 21, n.10, 1999.

JOAQUIM, J.G.; LUNA, S.P.; BRONDANI, J.T.; TORELLI, S.R.; RAHAL, S.C.; DE PAULA FREITAS, F. Comparison of decompressive surgery, eletroacupuncture, and decompressive surgery followed by electroacupuncture for the treatment of dogs with intervertebral disk disease with long-standing severe neurologic déficits. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, v. 236, n. 11, p. 1225-1229, 2010.

LAI, A.; CHOW, D. H.; SIU, W. S.; HOLMES, A. D.; TANG, F. H.; LEUNG, M. C. Effects of electroacupunture on a degenerated intervertebral disc using in vivo rat-tail model. *Proc.Inst. Mech. Eng.*, 222, p. 241-248, 2008.

LAIM, A.; JAGGY, A.; FORTERRE, F.; DOHERR, M.G.; AESCHBACHER, G.; GLARDON, O. Effects of adjunct eletroacupuncture on severity os postoperative pain in dogs undergoing hemilaminectomy because of acute thoracolumbar intervertebral disk disease. *JAVMA.*, v. 234, n.9, p. 1141-1146, 2009.

LATINI, E.; CURCI, E. R.; MASSIMIANI, A.; NUSCA, S. M.; SANTOBONI, F.; TRISCHITTA, D.; VETRANO, M.; VULPIANI, M. C. Ultrasonography for oxygen-ozone therapy in musculoskeletal diseases. *Medical Gas Research.*, v.9, n.1, p. 18-23, 2019.

LIN, SC; CHEN, FP. Comparison of Acupuncture and Electroacupuncture for the Treatment of Dogs with Thoracolumbar Intervertebral Disc Disease: a Randomized Controlled Trial. *Int J Vet Anim Med.*, v. 2, n.1, p.118, 2019.

LIU, C. M.; LIN, C. T. Retrospective study of a new standardized acupuncture treatment protocol on thoracolumbar spinal cord diseases in 84 dogs. *Pak Vet J.*, v. 35, p. 4, p. 461-465, 2015.

MAGALHÃES, F.N.O.; DOTTA, L.; SASSE, A.; TEIXEIRA, M.J.; FONOFF, E.T. Ozone Therapy as a Treatment for Low Back Pain Secondary to Herniated Disc: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Pain Physician.*, 15: E115-E129, 2012.

MUTO, M.; GIURAZZA, F.; SILVA, R.P.; GUARNIERI, G. Rational approach, technique and selection criteria treating lumbar disk herniations by oxygen–ozone therapy. *Interv Neuroradiol. Dec.*, v.v22, n. 6, p. 736-740, 2016.

OLBY, N. J.; DYCE, J.; HOULTON, J. E. F. Correlation of plain radiographic and lumbar myelographic findings with surgical findings in thoracolumbar disk disease. *Journal of Small Animal Practice.*, v. 35, n. 7, p. 345-350, 1994.

OLIVEIRA JUNIOR, J. O.; LAGES, G. V. Ozonioterapia em lombociatalgia. *Rev Dor.*, v. 13, n. 3, p. 261-270, 2012.

PENIDO, B.R.; LIMA, C.A.; FERREIRA, L.F.L. Aplicações da ozonioterapia na clínica veterinária. *PUBVET*, Londrina., v.4, n.40. 2010.

PETEOACĂ, A.; ISTRATE, A.; GOANȚĂ, A.M.; IONAȘCU, I.; TĂNASE, A. The use of ozone therapy in veterinary medicine: a systematic review. *AgroLife Scientific Journal.*, v. 9, n.2, 2020.

SCHWARTZ, A.; MARTÍNEZ; G.S.; SABBAH, F.; AVILÉS, M.H. *Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia.*, ISCO3, 3rd ed. 2020.

SCIORSI, R.L., LILLO, E., OCCHIOGROSSO, L.; RIZZO, A. Ozone Therapy in Veterinary Medicine: A Review. *Research in Veterinary Science.*, v. 130, p. 240–246, 2020.

STEPPAN, J.; MEADERS, T.; MUTO, M.; MURPHY, K. A Metaanalysis of the

Effectiveness and Safety of Ozone Treatments for Herniated Lumbar Discs. *J Vasc Interv Radiol.* v. 21, p. 534–548, 2010.

SUMIDA JM, MATERA JM, HAYASHI AM. Ozone therapy as pharmacopuncture for cervical pain in dogs. In: Proceedings of the 45th IVAS Annual Congress on Veterinary Acupuncture., Wroclaw., p. 91, 2019.

SUN, W.W., ZHAO, W. & WANG, T.H. Effects of Electro-acupuncture on PDGF Expression in Spared Dorsal Root Ganglion and Associated Dorsal Horn Subjected to Partial Dorsal Root Ganglionectomy in Cats. *Neurochem Res.*, 33, p.437–443, 2008.

TEIXEIRA, L.R; LUNA,S.P; TAFFAREL, M.O.; LIMA, A.F.; SOUSA, N.R.; JOAQUIM, J.G.; FREITAS, P.M. Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. *The Veterinary Journal.*, 197, p. 794-799, 2013.

TSAI, L.; LIN, Y.; HSIEH, C. Effects of Bee Venom Injections at Acupoints on Neurologic Dysfunction Induced by Thoracolumbar Intervertebral Disc Disorders in Canines: A Randomized, Controlled Prospective Study. *BioMed Research International.*, v. 2015, p. 1-7, 2015.

VIGLIANI, A.; BONIPERTI, E.; SCUDO, E. Paravertebral O₂–O₃ Treatment in Mechanical Lumbar Pain in Riding Horses. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia.*, v.4, p. 64-69, 2005.

WU, N.; ZHANG, S.; LIU, J.; ZHU, Q.; GU, R. Neuroprotective effects of electroacupuncture on early- and late-stage spinal cord injury. *Neural Regen. Res.* 10(10): p.1628-1634, 2015.

XIE, H.; PREAST, V. *Acupuntura Veterinária Xie*. Brasil: Ed. MedVet. 2011. 363 p.

YANG, J.H.; Lv, J.G.; WANG, H; NIE, H.Y. Electroacupuncture promotes the recovery of motor neuron function in the anterior horn of the injured spinal cord. *Neural Regen Res.*, v.10, n.12, p. 2033-2039, 2015.

YOVICH, J. C.; READ, R.; EGER, C. Modified lateral spinal decompression in 61 dogs

with thoracolumbar disk protrusion. *Journal of Small Animal Practice.*, v. 35, n. 7, p. 351-356, 1994.

7. ANEXOS



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

DECLARAÇÃO DE COAUTORIA

Eu, coautora do trabalho intitulado: “Ozone therapy in veterinary medicine: clinical indications and techniques”, afirmo estar ciente da utilização deste trabalho pela aluna **Juliana Midori Sumida**, mestranda do Programa de Pós-Graduação em clínica Cirúrgica Veterinária, nº USP 10839602, e afirmo que ele não será utilizado em nenhuma outra defesa de Tese ou Dissertação.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Ayne Murata Hayashi', is written over a horizontal line.

Ayne Murata Hayashi

São Paulo, 01 de julho de 2021.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

DECLARAÇÃO DE COAUTORIA

Nós, coautores do trabalho intitulado: “*Ozonioterapia versus Eletroacupuntura como tratamento de cães com discopatia toracolombar: estudo prospectivo randomizado e cego*”, afirmamos estar cientes da utilização deste trabalho pela aluna **Juliana Midori Sumida**, mestranda do Programa de Pós-Graduação em clínica Cirúrgica Veterinária, nº USP 10839602, e afirmamos que ele não será utilizado em nenhuma outra defesa de Tese ou Dissertação.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ayne Murata Hayashi', written over a horizontal line.

Ayne Murata Hayashi

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Julia Maria Matera', written in a cursive style.

Julia Maria Matera

São Paulo, 01 de julho de 2021.